



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554629_0006

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

KLONIERUNG UND SEQUENZIERUNG
VON RIFAMPICIN-RESISTENZGENEN

von

Peter Heinrich

aus

Aindling

1987

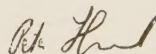
Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von 12 (3) der Promotionsordnung vom 5.3. 1981 von Prof. Dr. G.R. Hartmann betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 1.12. 1986



Peter Heinrich

Dissertation eingereicht am 1.12. 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G.R. Hartmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 8.1. 1987

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1983 bis November 1986 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G.R. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgeführt.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Hartmann für sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit aussprechen. Vor allem seine wissenschaftliche Förderung weiß ich sehr zu schätzen.

Herzlich danken möchte ich Katrin Reimer und Dieter Kotzick, die im Rahmen ihres "Biochemischen Fortgeschrittenen-Praktikums" wesentliche Beiträge zu dieser Arbeit lieferten.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. R. Mertz, Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Synthese der Oligonukleotide.

Danken möchte ich Frau Dr. S. Modrow und Dr. M. Motz, Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Durchführung der Sekundärstruktur-Analyse am VAX-Computer.

Frau H. Sieber danke ich für die Erstellung der Filmnegative.

Bedanken möchte ich mich auch bei B. Skrobranek und T. Lindner für geduldige Hilfestellungen bei der Computer-Benutzung.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern unseres Instituts für hervorragende Zusammenarbeit und wertvollen Diskussionen.

Meiner Familie

"Guten Tag", sagte der kleine Prinz.

"Guten Tag", sagte der Händler.

Er handelte mit absolut wirksamen, durststillenden Pillen. Man schluckt jede Woche eine und spürt überhaupt kein Bedürfnis mehr, zu trinken.

"Warum verkaufst du das?" sagte der kleine Prinz.

"Das ist eine große Zeitersparnis", sagte der Händler. "Die Sachverständigen haben Berechnungen angestellt. Man erspart dreiundfünfzig Minuten in der Woche."

"Und was macht man mit diesen dreiundfünfzig Minuten?"

"Man macht damit, was man will..."

"Wenn ich dreiundfünfzig Minuten übrig hätte", sagte der kleine Prinz, "würde ich ganz gemächlich zu einem Brunnen laufen..."

Der Kleine Prinz

Antoine des Saint-Exupéry

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL	8
2.1. Bakterienstämme, Plasmide, Bakteriophagen	8
2.2. Enzyme	9
2.3. Nukleinsäuren und Nukleotide	10
2.4. Chemikalien, Nährmedien und andere Materialien	11
2.5. Geräte	13
2.6. Zusammensetzung von Nährmedien	14
2.7. Verwendete Antibiotika	15
3. METHODEN	16
3.1. Bakterienvermehrung	16
3.1.1. Vermehrung auf Agarplatten	16
3.1.2. Aufzucht in Flüssigkultur	16
3.1.3. Herstellung transformationskompetenter Bakterien	17
3.1.4. Transformation von Bakterien	20
3.1.5. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration an Rifampicin	21
3.1.6. Wachstumskurven	21
3.1.7. Herstellung von "Replika-Filtern"	22
3.1.8. Aufbewahrung von Genbanken	22
3.1.9. Aufbewahrung von Bakterienstämmen	23
3.2. RNA-Polymerase-Aktivitätstest in Rohextrakten	24
3.3. Isolierung von DNA	26
3.3.1. Isolierung von zellulärer DNA aus <i>E.coli</i>	26
3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA über Dichtegradienten- zentrifugation	28

	Seite
3.3.3. Größenselektive Isolierung partiell gespaltener, zellulärer DNA über Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation	20
3.3.4. Isolierung von M13 RF DNA	32
3.3.5. Isolierung einzelsträngiger M13 Phagen-DNA	32
3.3.6. Reinigung von Oligonukleotiden durch Elektrophorese über Polyacrylamidgele	33
3.3.7. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	36
3.3.8. Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen	38
3.3.9. Reinigung und Konzentrierung von DNA	39
3.4. Enzymatische Reaktionen an DNA	40
3.4.1. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen	40
3.4.2. Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase	42
3.4.3. Auffüllen von versetzten Enden mit Klenow-Polymerase	42
3.4.4. [^{32}P]-Markierung von Oligonukleotiden mit T4 Polynukleotidkinase	44
3.4.5. Verkürzung von DNA-Fragmenten mit ExonukleaseIII + Nuklease S1	44
3.4.6. Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch T4 DNA-Ligase	45
3.4.7. [^{32}P]-Markierung von DNA durch Nick-Translation	46
3.5. Identifizierung rekombinanter DNA	47
3.5.1. Schnellverfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA	47
3.5.2. Kolonie-Hybridisierung	48
3.5.3. Transfer von DNA auf Nitrozellulose-Filter	49
3.5.4. Hybridisierung von DNA/DNA ("Southernblot")	50
3.5.5. Komplementaritätstest einzelsträngiger Phagen-DNA	52
3.6. DNA-Sequenzierung an einzelsträngiger M13-DNA nach dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren	52
3.7. DNA-Sequenzierung an doppelsträngiger Plasmid-DNA nach dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren	54
3.7.1. Isolierung der Plasmid-DNA für die Sequenzreaktion	56
3.7.2. Sequenzreaktion	57

	Seite
3.7.3. Auftrennung der Proben über "keilförmige" Sequenz-gele	60
3.8. Genomisches Sequenzieren nach dem Didesoxy-Ketten-abbruchverfahren	63
3.9. Gelelektrophoresen zur Auftrennung von DNA	64
3.9.1. Agarosegelelektrophorese	64
3.9.2. Polyacrylamidgelelektrophorese	64
3.9.3. Denaturierendes Polyacrylamidgel zur Auftrennung von Oligonukleotiden	65
3.10. Computeranalysen	66
3.10.1. Analyse von DNA-Sequenzen	66
3.10.2. Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen	66
4. ERGEBNISSE	67
4.1. Charakterisierung der Rifampicinaufnahmemutanten	67
4.1.1. Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin	66
4.1.2. Rifampicin-Empfindlichkeit der RNA-Polymerase	68
4.1.3. Wachstumsverhalten der Mutanten 10/1t und 5/3	70
- Wachstumskurven	71
- Wachstumskurven bei verschiedenen Rifampicin-konzentrationen	74
4.2. Klonierung eines Rifampicinresistenz-Gens	75
4.2.1. Erstellung einer Genbank der Rifampicinaufnahme-mutanten 10/1t und 5/3 in den Vektor pBR322	75
- Präparation des Vektors	80
- Isolierung der DNA-Fragmente aus der genomischen DNA	80
- Ligasereaktion: pBR322 mit fraktionierter DNA	84
- Transformation der rekombinanten DNA in kompetente DH1 Zellen	85
- Überprüfung der Qualität der Genbanken	87

	Seite
4.2.2. Selektion auf Klone mit Rifampicin-Resistenz	89
4.2.3. Charakterisierung der selektionierten Klone	92
4.3. Verkürzung des Rifampicin-resistenten Klon 3d-1	101
4.3.1. Herstellung von Deletionsklonen mit ExonukleaseIII	101
4.3.2. Herstellung von Subklonen aus dem 3d-1 Fragment	104
4.4. Charakterisierung des Klon 3d ^{rif}	107
4.4.1. Retransformierbarkeit des Klon 3d ^{rif}	107
4.4.2. Bestimmung der RNA Polymeraseaktivität des Klon 3d ^{rif} in Gegenwart von Rifampicin	108
4.4.3. Wachstumskurven von Klon 3d ^{rif} unter Einfluß von Rifampicin	110
4.4.4. Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin	112
4.4.5. Längenbestimmung und Restriktionskartierung von Klon 3d ^{rif}	113
4.5. Sequenzierung des Rifampicin-Resistenzgens von Klon 3d ^{rif}	120
4.5.1. Sequenzanalyse mittels "primer-extension"	121
4.5.2. Selektive Klonierung von Subfragmenten als Grundlage für eine Sequenzierungsstrategie	126
4.5.3. Bestimmung der Nukleotidsequenz durch Plasmidsequenzierung	129
4.5.4. Analyse des sequenzierten Rifampicin-Resistenzgens 3d ^{rif}	139
- Aminosäurezusammensetzung	145
- Codonauswahl	148
- Vorhersage der Sekundärstruktur	151
4.6. Klonierung des zum Rifampicin-Resistenzgen 3d ^{rif} homologen Gens aus dem <i>E.coli</i> Wildtyp AB1157	157
4.6.1. Erstellung einer Genbank aus <i>E.coli</i> AB1157 im Vektor pBR322	157
4.6.2. "Screening" der AB1157 Genbank mit dem Oligonukleotid W1	160

	Seite
4.6.3. Charakterisierung der Klone WT- α und WT- β	163
- Verhalten von Klon WT- α gegenüber Rifampicin	166
4.6.4. Sequenzanalyse des Klons WT- α	167
4.6.5. Direkte Sequenzierung der genomischen DNA von <i>E. coli</i> AB1157 analog dem Verfahren der Plasmidsequenzierung	175
4.6.6. Analyse des sequenzierten Klons WT- α	177
4.7. Vergleich des Rifampicin-Resistenzgens 3d ^{rif} mit Mu lysogenen Rifampicin-Mutanten	180
4.8. Klonierung eines RNA Polymerase-abhängigen Rifampicin-Resistenzgens	190
4.8.1. Erstellung einer Genbank aus der Rifampicin-resistenten Mutante 7/3 im Vektor pUC12	191
4.8.2. Selektion auf Rifampicin-resistente Klone	192
4.8.3. Charakterisierung von Klon rpoB ^{rif}	194
- Wachstumsverhalten gegenüber Rifampicin	194
- Hybridisierung des rpoB ^{rif} -Gens an andere Rifampicin-Resistenzgene im Southernblot	199
- Partielle Sequenzierung von Klon rpoB ^{rif}	203
- Restriktionskartierung von Klon rpoB ^{rif}	205
- Identifizierung des Mutationsortes innerhalb des rpoB ^{rif} -Gens durch Sequenzanalyse	211
5. DISKUSSION	216
6. ZUSAMMENFASSUNG	237
7. ANHANG	239
8. LITERATURVERZEICHNIS	243

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ap ^r	Ampicillin resistent
A _x	Extinktion bei einer Wellenlänge x
bp	Basenpaar
Ci	Curie (1Ci = 3.7 x 10 ¹⁰ Becquerel)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
D	Dalton
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonucleosid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Rif ^r	Rifampicin resistent
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer (0.089 M Tris-Borat, 0.089 M Borsäure, 2 mM EDTA)
Tc ^r	Tetracyclin resistent
Tc ^s	Tetracyclin sensitiv
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WASP	Wasser: gesättigte Ammoniumsulfatlösung: iso-Pro- panol (18 : 20 : 2), 5 mM EDTA
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

Verzeichnis der Tabellen und Figuren	Seite
Tab.1 Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin für die Mutanten 5/3, 10/1t und deren Ausgangsstamm <i>E.coli</i> AB1157	68
Tab.2 Rifampicinhemmung der RNA-Polymeraseaktivität in Zellextrakten von <i>E.coli</i> AB1157 und davon abgeleiteten Rifampicin-resistenten Mutanten	69
Tab.3 Wachstum der Stämme AB 1157, 10/1 und 5/3 auf LB-Platten mit und ohne Rifampicin	79
Tab.4 Bestimmung der Transformationsfrequenzen der klonierten DNA aus den Aufnahmemutanten 10/1t und 5/3	86
Tab.5 Selektion Rifampicin-resistenter Klone	91
Tab.6 Wachstumsverhalten der selektionierten Rifampicin-resistenten Klone gegenüber steigender Rifampicin-konzentration nach wiederholter Transformation	94
Tab.7 Längenbestimmung der Insertionen von Plasmiden Rifampicin-resistenter Klone	96
Tab.8 Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität in Zellextrakten von Rifampicin-resistenten Klonen	97
Tab.9 Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin in DHL-Medium aller Rifampicin-resistenter Klone und dem Ausgangsstamm DHL/pBR322	97
Tab.10 Anwachsrate der Rifampicin-resistenten Klone auf DHL-Agarplatten mit und ohne Rifampicin	99
Tab.11 Retransformation des Klon 3d ^{rif} und Selektion auf Rifampicin	108
Tab.12 Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität von Klon 3d ^{rif} durch Rifampicin	109
Tab.13 Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin für Klon 3d ^{rif}	112
Tab.14 Restriktionsenzym-Schnittstellen mit 6 bp-Erkennungssequenz auf dem <i>Bam</i> HI-Fragment von Klon 3d ^{rif}	115
Tab.15 Schnittstellen von Restriktionsendonucleasen mit Tetranukleotidsequenz auf dem <i>Bam</i> HI-Fragment von Klon 3d ^{rif}	118
Tab.16 Übersicht der besonderen Strukturmerkmale der Nukleotidsequenz des Rifampicin-Resistenzgens 3d ^{rif}	146
Tab.17 Aminosäurezusammensetzung von Leserahmen A und B im Vergleich zu anderen Proteinen	147

	Seite
Tab.18 Vergleich der Codonauswahl in stark und schwach exprimierten Genen mit der Codonzusammensetzung von Leserahmen A und B	150
Tab.19 Minimale Hemmkonzentration von Klon WT- α	166
Tab.20 Wachstumsverhalten von Klon rpoB ^{rif} in Gegenwart unterschiedlicher Rifampicinkonzentration	195
Tab.21 Übersicht der Restriktionsenzym-Schnittstellen im Rifampicin-Resistenzgen 3d ^{rif}	239
Fig.1 Über ein 16%-Sequenzgel gereinigtes Oligonukleotid	35
Fig.2 Typisches Sequenzgel von Plasmidsequenzierungen	62
Fig.3 Wachstumskurven des <i>E.coli</i> Wildtypstammes AB1157 und der Rifampicin-Aufnahmemutanten unter Rifampicineinfluß	73
Fig.4 Klonierungsstrategie zur Erstellung einer Genbank in den Vektor pBR322	79
Fig.5a Partielle Hydrolyse der zellulären DNA der Mutanten 10/lt und 5/3 mit <i>Sau3AI</i>	83
Fig.5b Präparation von 4-5 kb-Fragmenten der zellulären DNA der Mutanten 10/lt und 5/3 im Großmaßstab	83
Fig.6 Restriktionsverdauungen von Plasmid-Minipräparationen der 10/lt- und 5/3-Genbank	88
Fig.7 Restriktionsanalyse der Rifampicin-resistenten Klone durch Hydrolyse mit <i>SphI</i> - <i>ClaI</i>	96
Fig.8 Strategie zur Erzeugung von Deletionsklonen mit ExonukleaseIII + S1-Nuklease	103
Fig.9 Hydrolyse von Klon 3d-1 mit verschiedenen Restriktionsenzymen	105
Fig.10 Anordnung der <i>Bam</i> HI-Schnittstellen auf dem 3d-1-Fragment	105
Fig.11 Wachstumskurven des Klons 3d ^{rif}	111
Fig.12 Längenbestimmung der Insertion des Plasmids von Klon 3d ^{rif}	114
Fig.13 Restriktionsanalyse des <i>Bam</i> HI-Fragments von Klon 3d ^{rif}	114
Fig.14 Restriktionskarte des <i>Bam</i> HI-Fragments von Klon 3d ^{rif}	115

	Seite
Fig.15 Restriktionsanalyse des <i>Bam</i> HI-Fragments von Klon 3d ^{rif}	119
Fig.16 Sequenzstrategie zur Nukleotidbestimmung des <i>Bam</i> HI-Fragments von Klon 3d ^{rif} mittels "primer-extension"	124
Fig.17 Bestimmung der Nukleotidsequenz eines Teils des 3d ^{rif} -Gens durch M13-Didesoxy-Sequenzierung mit verschiedenen Oligonukleotiden als "Primer"	125
Fig.18 Sequenzierungsstrategie und Überblick der sequenzierten Subklone	132
Fig.19 Durch Plasmidsequenzierung ermittelte Nukleotidabfolge aus Bereichen des Rifampicin-Resistenzgens 3d ^{rif}	133
Fig.20 Nukleotidabfolge der am Gesamtklon 3d ^{rif} mit diversen Primern durchgeführte Sequenzreaktionen	133
Fig.21 Nukleotidsequenz des Rifampicin-Resistenzgens 3d ^{rif} und die entsprechenden Aminosäuren der Genprodukte	139
Fig.22 Struktur des Terminators	142
Fig.23 Terminatorstruktur	144
Fig.24 Verteilung der geladenen Aminosäuren innerhalb der von Leserahmen A und B kodierten Proteine	152
Fig.25 Vorhersage der Sekundärstruktur und Hydrophilizitätsmuster der Proteine A und B	155 u. 156
Fig.26 Präparation von 2-2.5 kb-Fragmenten aus der genomischen DNA von <i>E.coli</i> AB1157	158
Fig.27 Koloniehybridisierung der AB1157-Genbank mit dem [³² P]-markierten Oligonukleotid 5'-AAAGTCATGTTGG-TTTCGC-3'	162
Fig.28 Vergleichende Restriktionsanalyse der Plasmide von Klon WT- α und Klon 3d ^{rif}	165
Fig.29 Sequenzanalyse der Fragmentenden der selektionierten Klone WT- α und WT- β	165
Fig.30 Sequenzstrategie von Klon WT- α und Überblick der Subklone	168
Fig.31 Nukleotidsequenz des zum Rifampicin-Resistenzgen 3d ^{rif} homologen DNA-Abschnitts von Klon WT- α und die entsprechende Aminosäuresequenz der Genprodukte	169
Fig.32 Sequenzgel nach direkter Sequenzierung chromosomaler <i>E.coli</i> AB1157-DNA	176

	Seite
Fig.33 Sequenzanalyse der gegenüber dem Rifampicin-Resistenzgen $3d^{rif}$ veränderten Positionen im Wildtyp-Klon WT- α	178
Fig.34 Restriktionskarte der Mu cIts Ap-DNA	181
Fig.35 Hybridisierung des $3d^{rif}$ - und β -Lactamasegens an <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI oder <i>Dra</i> I hydrolysierte Mu-Mutanten- bzw. <i>E.coli</i> AB1157-DNA	183
Fig.36 Wachstumskurven von Klon $rpoB^{rif}$ in Gegenwart unterschiedlicher Rifampicinkonzentration	198
Fig.37 Hybridisierung von pUC12-, $3d^{rif}$ - und $rpoB^{rif}$ -DNA an hydrolysierte DNA aus Mu-Mutanten und <i>E.coli</i> AB1157	201
Fig.38 Nukleotidsequenz eines Endes der Insertion von Klon $rpoB^{rif}$	203
Fig.39 Restriktionskarte des <i>rpoB</i> -Operon aus <i>E.coli</i> und der DNA von Klon $rpoB^{rif}$	205
Fig.40 Hydrolyse der Plasmid-DNA von Klon $rpoB^{rif}$ mit verschiedenen Restriktionsenzymen	208
Fig.41 Hydrolyse der Plasmid-DNA von Klon $rpoB^{rif}$ mit verschiedenen Restriktionsenzymen und anschließender Hybridisierung an die [32 P] nicktranslatierte Plasmid-DNA von $rpoB^{rif}$ bzw. an die pUC12-DNA	210
Fig.42 Nukleotidsequenz und entsprechende Aminosäuresequenz des Segments des <i>rpoB</i> -Gens, in welchem die bislang gefundenen, zur Rifampicin-Resistenz führenden Mutationen lokalisiert sind	213
Fig.43 Sequenzanalyse von Klon $rpoB^{rif}$	215

1. EINLEITUNG

Rifampicin ist ein halbsynthetisches Derivat der Rifamycine, einer Antibiotikaklasse, die vom gram-positiven Stamm *Nocardia mediterranei* (Maggi *et al.*, 1966) produziert wird. Das Antibiotikum Rifampicin zeichnet sich aus durch ein breites antibakterielles Spektrum und ist schon in geringen Mengen gegenüber Mycobakterien und gram-positiven Organismen wirksam. Bedeutung hat es erlangt durch seine stark tuberkulostatische Wirkung und wird deshalb in der Klinik zur Behandlung von Tuberkulose-Erkrankungen eingesetzt (Binda *et al.*, 1971). Hartmann *et al.* (1967) wiesen als erste die hemmende Wirkung dieses Antibiotikums auf die RNA-Polymerase aus *E.coli* nach. Weitere Untersuchungen zeigten, daß Rifampicin *in vitro* in der RNA-Polymerase an die β -Untereinheit bindet und dadurch die Synthese langkettiger RNA verhindert (Kessler, 1979; Hartmann *et al.*, 1985; Wehrli, 1983). Die Hemmung der RNA-Synthese bringt das bakterielle Wachstum zum Erliegen.

Sind die molekularen Ursachen der Rifampicinwirkung vielfach untersucht (Kessler, 1979; McClure and Cech, 1978; Hartmann *et al.*, 1985), so liegen noch wenige Erkenntnisse über die Aufnahme des Antibiotikums in die Bakterienzelle vor. Bei der Diskussion möglicher Aufnahmemechanismen spielt der Aufbau der Zellmembran eine entscheidende Rolle. Mit Ausnahme der Mycoplasmen bilden alle Bakterien Zellwände aus, wobei allen Eubakterien die Zellwandkomponente Murein oder Peptidoglycan, welches der Zelle eine mechanische Festigkeit verleiht, gemeinsam ist. Alle gram-negativen Bakterien enthalten neben der inneren Membran (Cytoplasmamembran) eine zusätzliche Schicht in der Zellwandstruktur, nämlich die außerhalb der Peptidoglycanschicht gelegene äußere Membran, welche

im Elektronenmikroskop ein trilaminaires Aussehen hat (Glauert and Thornley, 1969) und vorwiegend Phospholipide, Proteine und Lipopolysaccharide enthält (Osborn, 1979). Die äußere Membran hat bei den gram-negativen Bakterien eine sehr wichtige Funktion inne, denn sie wirkt als Barriere gegen das Eindringen des vom Wirt als Abwehrgentien ausgeschiedenen Lysozyms, β -Lysins und verschiedener leukocytischer Proteine, die jedoch gegenüber gram-positiven Organismen äußerst toxisch sind (Donaldson *et al.*, 1974; Patterson-Delafield *et al.*, 1980). Die Aufklärung des Aufnahmemechanismus von Antibiotika bei *E.coli* wird durch den Umstand erschwert, daß die äußere Membran von Enterobakterien und einigen anderen gram-negativen Bakterien als starke Permeabilitätsbarriere gegenüber vielen Antibiotika wirkt, die gegenüber gram-positiven Bakterien Wirkung zeigen, w.z.B. Macrolide, Rifamycine, Lincomycine und Clindamycin (Nikaido and Nakae, 1979). Auch wenn die Gegenwart der äußeren Membran die Diffusion des Antibiotikums nur verlangsamt, versetzt dieser Umstand die Bakterien in die Lage, die kleinen Mengen des eindringenden Antibiotikums zu inaktivieren. Darin mag auch der Grund liegen, daß bei gram-negativen Bakterien unschwer relativ hohe Resistenzgrade erzeugt werden können (Richmond and Curtis, 1974). Diese Fakten dürften auch eine Erklärung für die in vielen Krankenhäusern vorherrschenden gram-negativen Infektionen (Nikaido and Vaara, 1985) sein.

Die äußeren Membranen der gram-negativen Bakterien müssen auch die Aufnahme von Nährstoffen und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten gewährleisten, sei es durch Diffusion oder durch besondere Transportmechanismen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die äußere Membran für hydrophile Substanzen mit der Molmasse <600 Dalton durchlässig ist (Decad and Nikaido, 1976). Verantwortlich

dafür sind die von den *E.coli* K12-Genen *ompF*, *ompC* und *phoE* kodierten Proteine (bezeichnet als Porine), welche relativ unspezifische Poren oder Kanäle bilden, die wiederum diesen kleinen hydrophilen Substanzen eine Permeation durch die äußere Membran erlauben. Die Porine interagieren sehr stark mit den Lipopolysacchariden und diese Interaktion hat einen sehr starken Einfluß auf die Funktion der Porine, denn Schindler und Rosenbusch (1981) konnten zeigen, daß Lipopolysaccharide für die Öffnung und Stabilität des Kanals verantwortlich sind. Jedoch kann Rifampicin wegen seines hohen Molekulargewichts und seiner lipophilen Natur nicht über die Benutzung eines von Porinen gebildeten Kanals in die Bakterienzelle dringen und man nimmt an, daß das Rifampicin sich im lipophilen Inneren der äußeren Membran löst und über ein Verteilungsgleichgewicht das Cytoplasma erreicht (Nikaido, 1979; Nikaido and Vaara, 1985). Ähnliche Aufnahmemechanismen fordert man auch für andere hydrophobe Antibiotika (z.B. Macrolide, Novobiocin, Actinomycin D), für Detergentien (z.B. SDS, Triton X-100) und für hydrophobe Farbstoffe (z.B. Eosin, Methylenblau, Brilliant Grün) (Leive, 1974; Nikaido and Nakae, 1979).

Für die Nichtbeteiligung der Porine am Transport großer hydrophober Moleküle sprechen auch die Ergebnisse aus den Versuchen mit Mutanten, welchen ein oder mehrere Porine oder das OmpA-Protein fehlte, denn diese zeigten eine unveränderte Sensitivität gegenüber hydrophoben Antibiotika, Farbstoffen und Detergenzien (Henning and Haller, 1975; Schweizer *et al.*, 1976, Sonntag *et al.*, 1978). Für den Transport des Rifampicins in das Cytoplasma darf die Benutzung eines spezifischen *E.coli* Transportproteins nicht völlig ausgeschlossen werden, nachdem Seydel *et al.* (1981) ein Rifampicin-bindendes Protein beschrieben haben, welches Rifampicin

um den Faktor 10^5 schwächer als die RNA-Polymerase zu binden vermag. Parallelen bieten sich hier zu dem LamB-Protein an, einem Protein der äußeren Membran, das normalerweise für den Transport von Maltose und Maltosedextrin eingesetzt ist, aber vom Phagen Lambda als Rezeptor mißbraucht wird (Hazelbauer, 1975).

Eine bewährte und eigentlich auch klassische Methode zur Aufklärung von Transportvorgängen besteht in der Erzeugung von Mutanten, die bezüglich des zu untersuchenden Vorgangs defekt sind. Auf die Frage des Rifampicin-Transports übertragen bedeutet das, Untersuchungen an Rifampicin-resistenten Stämmen durchzuführen. Im allgemeinen versteht sich die bakterielle Resistenz gegenüber Antibiotika entweder als Folge einer Veränderung des Zielorts oder als Folge eines verlangsamten Erreichen desselben, sei es nun durch Inaktivierung des Antibiotikums oder durch Abnahme der Permeabilität der bakteriellen Membran (Wehrli, 1983). Rifampicin-Resistenzen können durch Mutationen des Zielorts (der RNA-Polymerase) sehr leicht erzeugt werden und wurden bereits molekularbiologisch charakterisiert. Diesen Ergebnissen zufolge findet man alle zur Rifampicin-Resistenz führenden Mutationen in zwei verschiedenen Regionen des *rpoB*-Gens, welches für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert (Ovchinnikov *et al.*, 1981, 1983; Lisitsyn *et al.*, 1984), wobei die meisten Mutationen sich in einem Bereich von etwa 50 Aminosäuren in der Mitte der Polypeptidkette befinden. Die Resistenz gegenüber Rifampicin stellt keine Alles- oder Nichts-Reaktion dar, denn es wurde bislang eine Vielzahl an Mutanten unterschiedlichen Resistenzgrads gefunden (Ovchinnikov *et al.*, 1981, 1983; Dabbs, 1982; Wehrli, 1983).

Lange Zeit blieb die Frage ungeklärt, ob es auch Mutanten gibt, deren Rifampicin-Resistenz auf eine Veränderung der Membran-Permeabilität zurückzuführen ist. Mindlin *et al.* (1972) sprach sich entschieden gegen die Existenz von Permeabilitätsmutanten aus, da alle von dieser Arbeitsgruppe untersuchten Mutanten innerhalb des Genorts für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase bei 90 Minuten auf dem *E. coli* Chromosom kartierten. Yamamoto und Nomura (1979) und auch Wehrli (1983) hielten jedoch eine Rifampicin-Resistenz aufgrund von Veränderungen der Permeabilität durchaus für möglich. Genährt wurde diese Hoffnung auch von den Beobachtungen, daß bei den hydrophilen Antibiotika wie der β -Lactamase und dem Tetracyclin durch Mutationen von Proteinen der äußeren Membran eine Resistenz gegen diese erzeugt wurde (Komatsu *et al.*, 1981; Harder *et al.*, 1981). Obgleich, wie oben besprochen, die Porine für die Penetration des Rifampicins wegen dessen hohen Molekulargewichts nicht verantwortlich sind, könnten durchaus anderen mutierten Membranproteinen eine entscheidende Rolle in der verhinderten Rifampicinaufnahme zukommen. Die Diskussion um die prinzipielle Frage der Existenz von Rifampicin-Aufnahmemutanten beendete schließlich Tropschug (1980), dem es gelang, durch Nitrosoguanidin-Behandlung aus *E. coli* Mutanten zu isolieren, deren RNA-Polymerasen im *in vitro*-Aktivitätstest eine dem Wildtyp vergleichbare Sensitivität aufwiesen, aber im Rifampicin-haltigen Medium eindeutig Wachstum zeigten.

Die bislang angestrebten Untersuchungen zur Klärung der Resistenzursache zeigten, daß die Rifampicin-Resistenz bei allen Aufnahmemutanten zu einem verlangsamten Wachstum führte (Tropschug, 1981). Die genaue biochemische Analyse einer Mutante konnte den Verlust von drei Proteinen der äußeren Membran aufzeigen. In der

Lipid- und Lipopolysaccharidzusammensetzung wurden jedoch keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp beobachtet (Tropschug, 1981). Auch Untersuchungen von Kollenda (1981) konnten bei einer Mutante Veränderungen in der Komposition der Membranproteine aufdecken. Die Expression der Resistenz ließ sich auch durch Pl-Transduktion eines definierten Genabschnitts in einen sensitiven Stamm erzielen (Kollenda, 1985).

Durch genetische Kartierung von Mu-lysogenen, Rifampicin-resistenten Mutanten konnte der Genort der Mutation zur Rifampicin-Resistenz für alle mit dem Bakteriophagen Mu erzeugten Mutanten zwischen 28 und 37 Minuten auf dem *E.coli* Chromosom angegeben und somit als *rpoB*-unabhängig klassifiziert werden (Kollenda, 1985).

PROBLEMSTELLUNG

Die bisherigen Untersuchungen zur Aufklärung der Resistenzursache der Rifampicin-Aufnahmemutanten beschränkten sich auf die biochemische Analyse der Membranzusammensetzung (Tropschug, 1981; Kollenda, 1981). Es konnten jedoch keine zwingenden Hinweise erbracht werden, ob nun Veränderungen der Proteine der inneren oder äußeren Membran oder sogar beider oder ob vielleicht Veränderungen der Lipid- oder Polysaccharidzusammensetzung als Ursache für die Resistenz anzusehen sind. Gezeigt werden konnte jedoch von Kollenda (1981, 1985) durch Pl-Transduktion die Übertragbarkeit eines DNA-Abschnittes mit Resistenzmutation in einen anderen *E.coli*-Stamm. Ein Ziel dieser Arbeit war nun, diese Übertragbarkeit der Resistenzeigenschaft auf Plasmid-Ebene mittels Klonierung zu untersuchen. Denn die Klonierung eines DNA-Abschnittes, der einem ursprünglich sensitiven *E.coli* Stamm eine Resistenz gegenüber Ri-

fampicin verleiht und eine Transformation in verschiedene Bakterienstämme könnte eine eindeutige Abgrenzung von RNA-Polymerase-Mutanten erlauben und würde zudem ein in beliebiger Menge verfügbares Material für weitere, zur Aufklärung der Resistenzursache notwendigen, molekularbiologischen Untersuchungen liefern.

Ein weiteres Ziel war, Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen dem klonierten Resistenzgen aus der Rifampicin-resistenten Mutante und dem analogen DNA-Bereich des Wildtyp-Stammes zu erarbeiten.

Untersucht werden sollte ferner noch, ob die von Kollenda (1985) und Kollenda *et al.* (1986) durch lysogene Insertion des Bakteriophagen Mu kreierte, neue Klasse von Rifampicin-resistenten *E.coli*-Mutanten mit dem klonierten Resistenzgen nicht nur die phänotypische Resistenz gemeinsam hat, sondern ob eventuell auch eine Homologie bezüglich des Genorts vorhanden ist.

Versucht werden sollte ferner, eine Antwort auf die Frage zu geben, ob alle von Tropschug (1981) durch Nitrosoguanidin-Behandlung erzeugten Rifampicin-Aufnahmemutanten einer einheitlichen Resistenzklasse angehören.

2. MATERIAL

2.1. BAKTERIENSTÄMME, PLASMIDE, BAKTERIOPHAGEN

Aus der Stammsammlung der Abteilung Prof. Hartmann waren:

E.coli AB1157, *E.coli* K12, die Rifampicin-Aufnahmemutanten *E.coli* 10/1t, 5/3, 7/3, die Mu-lysogenen Stämme RifM1, RifM3, RifM4.

Das Plasmid pBR322 (Bolivar *et al*, 1977) sowie *E.coli* HB101 (Boyer and Roulland-Dussoix, 1969).

Zur Verfügung gestellt wurden von der Abteilung Winnacker:

E.coli DH1 (Hanahan, 1983), JM83 (Vieira and Messing, 1982), die Plasmide pUC8 (Vieira and Messing, 1982) und pUC12 (Messing and Vieira, 1982).

Die Vektoren M13mpl0 und M13mpl1 (Messing and Vieira, 1982) (waren ein Geschenk der Arbeitsgruppe Prof. Piepersberg.

Über Firmen bezogen wurden:

E.coli JM103 (Messing *et al*, 1981) (BRL, Maryland USA)

Die Vektoren M13mpl8 und M13mpl9 (Norrandar *et al*, 1983) (BRL, Maryland USA)

Die Vektoren pUC18 und pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) (Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg)

2.2. ENZYME

Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; New England Biolabs, Schwalbach; Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu Isenburg sowie Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg bezogen.

Weitere Enzyme

New England Biolabs, Schwalbach:

Klenow-Fragment der DNA-PolymeraseI, T4 Polynukleotidkinase, T4 DNA-Ligase

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Alkalische Phosphatase, ExonukleaseIII, Klenow-Fragment der DNA-PolymeraseI, Lysozym, Nuklease S1, Proteinase K, Ribonuklease A, Ribonuklease T1, T4 DNA-Ligase.

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

Klenow-Fragment der DNA-PolymeraseI

E. Merck, Darmstadt:

Proteinase K aus Pilzen

P.H. Stehelin & Cie AG, Basel:

Klenow-Fragment der DNA PolymeraseI; T4 DNA-Ligase.

2.3. NUKLEINSÄUREN UND NUKLEOTIDE

Amersham und Buchler, Braunschweig:

[α - ^{35}S] thiodATP (650Ci/mMol); [α - ^{32}P] dATP (3000Ci/mMol);
 [α - ^{32}P] dCTP (3000 Ci/mMol); [α - ^{32}P] UTP (3000Ci/mMol)
 [γ - ^{32}P] ATP (3000 Ci/mMol);

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Hefe tRNA; 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP); Ribonukleosid-5'-triphosphate (ATP, CTP, GTP, UTP).

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate.

BRL GmbH, Neu Isenburg:

M13 Cloning/Dideoxy Sequencingkit

Sigma Chemie GmbH, München:

Kalbsthymus-DNA

Oligonukleotide:

Die Synthese aller verwendeten Oligonukleotide wurden von T. Dörper (Institut für Biochemie, Universität München) bzw. R. Mertz (Genzentrum der Universität München) am vollautomatischen "DNA-Synthesizer" Modell 380 A der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

2.4. CHEMIKALIEN, NÄHRMEDIEN UND ANDERE MATERIALIEN

Amersham und Buchler, Braunschweig:

Hybond-N (Nylon) Membrane

Bender & Hobein, München:

Whatman 3MM Papier; Whatman-Anionenaustauscher DE-52.

Brand, Wertheim:

Einmal-Mikropipetten (10 µl)

J.T. Baker Chemical Co, Philipsburg, New Jersey, USA:

Cäsiumchlorid

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Chloramphenicol; Ethidiumbromid; Rifampicin.

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Bacto-Yeast-Extrakt.

Fluka Feinchemikalien, Neu Ulm:

Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan.

Fuji:

Röntgenfilme RX IF.

Kodak Limities:

Röntgenfilme X-Omat AR (etwa 4fach empfindlicher als Fuji RX IF).

E. Merck AG, Darmstadt:

Ammoniak; Ammoniumsulfat; Ammoniumperoxydisulfat; Ammoniumacetat;
 Borsäure; Bromphenolblau; 1-Butanol; 2-Butanol; Chloroform; Coomassie Brilliantblau R 250; Dimethylformamid; Ethanol; Ethidiumbromid; Formamid; Glycerin; Harnstoff; Kaliumchlorid; Kaliumhydroxid; Kieselgel 60 F 254 DC-Platten; Lithiumchlorid; Magnesiumchlorid; Natriumperchlorat;
 Magnesiumsulfat; Methanol; Natriumcarbonat; Natriumchlorid; Natriumcitrat; Natriumdesoxycholat; Natriumsulfat; Natriumdodecylsulfat (SDS); Phenol; Triton X-100; Xylencyanol.

Photo Schaja:

Polaroidfilm Typ 107.

Renner GmbH, Darmstadt:

Petrischalen.

Schleicher & Schüll, Dassel:

DEAE-Cellulose-Membran, NA-45; Nitrocellulose-Filter, BA-85

Serva, Heidelberg:

Acrylamid; Ampicillin; Glaswolle (silanisiert); Dialyseschläuche; Ethanol; Ethylendiamintetraessigsäure; Harnstoff; Mercaptoethanol; N,N'-Methylen-bisacrylamid; Natriumdodecylsulfat; Polyvinylpyrrolidon (PVP); Silikonlösung; N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED); 2-Xylencyanol.

Sigma Chemie, München:

Agarose Typ II, Agarose Typ VII; 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal); Dimethyldichlorsilan; gamma-(methacryloxy)-

propyltrimethoxysilan; Isopropyl- β -D-Thio-Galactopyranosid (IPTG);
 Lysozym; Rifampicin; Rinderserumalbumin; Tetracyclin; Tris-
 (hydroxamethyl)-aminomethan (Tris).

2.5. GERÄTE

American Instrument Company, USA:

Aminco French Pressure Cell Press, J5-598AE.

Beckman Instruments GmbH, München:

Ultrazentrifuge L8-70; Microgenie™, Sequence software.

Branson Sonic Power Company, Schwäbisch Gmünd:

Sonifier Bl2.

IBM Deutschland GmbH:

Personal Computer XT.

LKB, Gräfelfing:

Macrophor™ Sequencing System.

Microsoft GmbH, Taufkirchen:

Word, Textverarbeitungsprogramm.

Sigma, Taufkirchen:

Sigma 2MK, kühlbare Tischzentrifuge.

Sorvall Instruments, Bad Nauheim:

Zentrifuge Sorvall RC-5 und RC-5C;

Vetter GmbH, Wiesloch:

UV-Lampe Chroma 41

2.6. ZUSAMMENSETZUNG VON NÄHRMEDIEN

YT-Medium:

8 g Bacto-Trypton, 5 g Yeast-Extract, 5 g NaCl, 1 l deionisiertes Wasser.

LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton, 5 g Yeast-Extract, 5 g NaCl, 1 l deionisiertes Wasser.

DH1-Medium:

20 g Bacto-Trypton, 5 g Yeast Extract, 5 g $MgSO_4$ (in Gegenwart von Tetracyclin 5 g NaCl), mit 2N KOH auf pH 7.6 eingestellt, 1 l deionisiertes Wasser.

M9-Medium:

6 g Na_2HPO_4 , 3 g NaH_2PO_4 , 0.5 g NaCl, 1 g NH_4Cl , 2 g Casamino-säuren, 2 mM Mg_2SO_4 , 0.2% Glucose, 0.1 mM $CaCl_2$, 1 l deionisiertes Wasser, pH 7.4. Mg_2SO_4 , Glucose und $CaCl_2$ nach dem Autoklavieren zugegeben.

Agarplatten:

15 Bacto-Agar pro 1 l Medium

Weichagar:

6 g Bacto-Agar pro 1 l Medium

2.7. VERWENDETE ANTIBIOTIKA

Ampicillin:

25 mg/ml Stammlösung in Wasser

Chloramphenicol:

34 mg/ml Stammlösung in Ethanol

Rifampicin:

100 µg/ml Stammlösung in Wasser

10 mg/ml Stammlösung in Methanol

Tetracyclin:

15 mg/ml Stammlösung in Ethanol

3. METHODEN

3.1. BAKTERIENVERMEHRUNG

3.1.1. Vermehrung auf Agarplatten

Transformierte *E.coli*-Zellen wurden auf L-Broth- oder DHL-Vollmedium Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die gewachsenen Kolonien mit einer sterilen Impföse abgepickt und einer weiteren Verwendung zugeführt.

Herstellung des Mediums: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl und 15 g Bacto-Agar (LB-Medium) bzw. 20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g MgSO₄ und 15 g Bacto-Agar (DHL-Medium) werden in einem Liter destilliertem Wasser autoklaviert, auf 60°C abgekühlt, bei Bedarf mit einer sterilen Lösung des entsprechenden Antibiotikums versetzt und anschließend in sterile Plastik-Petrischalen gegossen. Die Endkonzentration an Ampicillin betrug üblicherweise 100 µg/ml, jedoch 50 µg/ml bei gleichzeitiger Verwendung zweier Antibiotika, die an Tetracyclin 15 µg/ml und die an Rifampicin variierte in der jeweils angegebenen Weise. Nach dem Erstarren und Trocknen des Mediums bei Raumtemperatur wurden die Platten mit Aluminiumfolie lichtfrei verpackt und bei 4°C bis zu drei Wochen gelagert.

3.1.2. Aufzucht in Flüssigkultur

L-Broth Medium (10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 l destilliertes Wasser) bzw. DHL Medium (20 g Bacto-Trypton, 5 g MgSO₄ auf 1 l destilliertes Wasser) wurde autoklaviert und bei Be-

darf mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt: 100 µg/ml Ampicillin (50 µg/ml bei Verwendung zweier Antibiotika), 12.5 µg/ml Tetracyclin und eine jeweils angegebene Konzentration an Rifampicin. Das 37°C warme Medium wurde mit 20 ml einer 1:50 verdünnten Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Plasmidhaltigen *E.coli* Zellen wurde, zur Stimulierung der Plasmidsynthese, bei $A_{550} = 0.8$ Chloramphenicol (34 mg/ml Ethanol) bis zu einer Endkonzentration von 170 µg/ml zugegeben und die Inkubation im Bakterienschüttler bei 37°C über Nacht fortgesetzt, jedoch nicht länger als 16 Stunden. Die Bakterien wurden am nächsten Tag durch Zentrifugation geerntet.

3.1.3. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

a) Herstellung kompetenter HB101 und JM83 Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter HB101 und JM83 *E.coli* Zellen erfolgte in Anlehnung an Cohen *et al.* (1972) und Maniatis *et al.* (1982). 100 ml 37°C warmes L-Broth Medium wurde mit 5 ml einer 1:50 verdünnten Übernachtskultur des betreffenden Stammes angeimpft (HB101 für die Transformation mit pBR-Plasmiden, JM83 für die Transformation mit pUC-Plasmiden), bei 37°C bis zu einer $A_{550} = 0.5$ wachsen gelassen und durch 5minutige Zentrifugation bei 7000 Upm und 4°C geerntet. Der Bakterienniederschlag wurde in 50 ml eiskalter Lösung von 50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl pH 8.0 suspendiert und 15 min im Eiswasser belassen. Danach wurde erneut 5 min bei 7000 Upm und 4° zentrifugiert und der Bakterienniederschlag in 4 ml eiskalter Lösung von 50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl pH 8.0 auf-

genommen. Diese Bakterien wurden direkt für die Transformation eingesetzt.

Transformationskompetente Zellen können auch für längere Zeit in einem aktiven Zustand konserviert werden. Hierfür müssen die Zellen nach der letzten Zentrifugation mit 4 ml eiskalter Lösung von 50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl, 15% Glycerin aufgenommen und in 200 μl Aliquots bei -80°C aufbewahrt werden.

b) Herstellung kompetenter DH1 Zellen (Hanahan, 1983)

5 ml DH1 Medium (20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g MgSO_4 pro Liter, mit KOH auf pH 7.6 eingestellt) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft, etwa zwei Stunden bis zum Erreichen einer Zelldichte $A_{550} = 0.3$ bei 37°C geschüttelt und anschließend mit 95 ml 37°C warmen DH1 Medium verdünnt. Die Bakterienkultur wurde sodann bis zu einer $A_{550} = 0.48$ weitergeschüttelt, danach 5 Minuten im Eiswasser abgekühlt und anschließend 5 Minuten bei 7000 Upm in einem Sorvall SS34-Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der Bakterienniederschlag wurde in 40 ml sterilfiltriertem TfbI-Medium (30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl_2 , 10 mM CaCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 15% Glycerin, mit 0.2 M Essigsäure auf pH 5.8 eingestellt) suspendiert, 5 Minuten auf Eis belassen und anschließend wieder abzentrifugiert (SS34-Rotor, 7000 Upm, 5 Minuten, 4°). Der dabei erhaltene Bakterienniederschlag wurde in 4 ml sterilfiltriertem TfbII-Medium (10 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl_2 , 15% Glycerin, mit KOH auf pH 6.5 eingestellt) aufgenommen, 15 Minuten im Eiswasser inkubiert und anschließend in 200 μl Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

c) Herstellung kompetenter JM103 Zellen (nach Messing, 1983)

Für die Transformation von *E.coli* JM103 Zellen mit rekombinierten M13 RF Molekülen ist es wichtig sicherzustellen, daß die Wirtszellen das für die F-Pilus Synthese erforderliche Plasmid, welches für die M13 Infektion notwendig ist, nicht verlieren. Da dieses Plasmid auch ein für Prolin kodierendes Gen trägt (während der Wirt eine Deletion des Prolin-Gens aufweist), wird eine Selektion durch Wachstum auf Glucose/Minimalmedium Agarplatten durchgeführt. *E.coli* JM103 Zellen wurden auf M9 Minimalmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Einzelkolonie davon wurde in 20 ml YT-Medium (8 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 Liter) überimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Die so erhaltene Übernachtskultur wurde mit 37°C warmen YT Medium 1:100 verdünnt und bis zum Erreichen einer $A_{550} = 0.3 - 0.4$ weiterinkubiert (nach etwa 1.5 - 2 Stunden). Danach wurden die Zellen für 5 Minuten auf Eis gestellt und anschließend abzentrifugiert (7000 Upm, 5 Minuten, 4°C). Der Bakterienniederschlag wurde mit der Hälfte des Wachstumsvolumens an steriler CaCl_2 -Lösung (50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl pH 8.0) aufgenommen, 20 Minuten auf Eis belassen und danach abzentrifugiert (7000 Upm, 5 Minuten, 4°C). Der Bakterienniederschlag wurde in einem Zehntel des Wachstumsvolumens an eiskalter, steriler CaCl_2 -Lösung (50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) aufgenommen. Die Zellen wurden zumeist sofort, spätestens jedoch am nächsten Tag für die Transformation verwendet. Eine Aufbewahrung bei -80°C ist nicht zu empfehlen, da hiermit ein zu starke Einbuße der Transformationsrate verbunden ist.

3.1.4. Transformation von Bakterien

a) Transformation von HB101 und JM83 (nach Hanahan, 1983)

200 µl frische oder bei 0°C aufgetaute, kompetente Bakterien wurden mit 5 ng Wildtyp Plasmid DNA oder mit 10-200 ng ligierter DNA, die in 50-100 µl TE-Puffer gelöst war, versetzt und 40 Minuten bei 0°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein 2minütiger Hitzeschritt bei 42°C und nach Zugabe von 1 ml, 37°C warmen L-Broth Medium wurde 1 Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Je nach eingesetzter DNA-Menge wurden geeignete Aliquots dieses Ansatzes auf L-Broth Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei der Transformation von JM83-Zellen mit pUC-Plasmiden wurden zur Unterscheidung zwischen rekombinanten (weiße Kolonien) und Wildtyp-Plasmiden 50 µl einer 2% X-Gal-Lösung mit auf die Agarplatte aufgetragen.

b) Transformation von DH1 Zellen (nach Hanahan, 1983)

Die Transformation von DH1 Zellen erfolgte analog der von HB101 und JM83 Zellen nur mit dem Unterschied, daß hier DH1 Medium (20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g MgSO₄, mit KOH auf pH 7.6 eingestellt) verwendet wurde.

c) Transformation von JM103-Zellen (nach Messing, 1983)

1 ng M13 mp10 RF-DNA, gelöst in einem Gesamtvolumen von 50 µl TE-Puffer, wurde mit 0.3 ml kompetenten JM103-Zellen versetzt und 40 Minuten lang auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschritt für 2 Mi-

nuten bei 42°C wurden 10 µl 100mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, gelöst in Wasser), 50 µl 2% X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid, gelöst in N,N-Dimethylformamid), 0.2 ml logarithmisch wachsende JM103 Zellen und 3 ml 45°C warmer Weich-Agar zugegeben, gut gemischt und auf YT-Agarplatten ausgegossen. Nach Erstarren des Weich-Agars erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C.

Herstellung des Weich-Agars: 6 g Bactoagar pro 1 Liter YT-Medium werden autoklaviert, anschließend auf etwa 50°C abgekühlt und bei dieser Temperatur verarbeitet.

3.1.5. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration an Rifampicin

Die minimale Hemmkonzentration für verschiedene Antibiotika kann im Strichtest auf Agarplatten (Zähner und Maas, 1972) bestimmt werden. Hierbei wurde 1 µl einer *E. coli* Übernachtskultur mit einer sterilen Impföse auf Agarplatten unterschiedlicher Rifampicin-Konzentration ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die niedrigste Antibiotikumkonzentration, bei der kein Wachstum mehr auftrat, entsprach der minimalen Hemmkonzentration.

3.1.6. Wachstumskurven

200 ml vorgewärmtes Vollmedium wurde mit 2 ml einer 1:20 verdünnten Übernachtskultur angeimpft und im Bakterienschüttler bei 37°C mit 120 Upm geschüttelt. In definierten Zeitabständen wurde 1 ml der Bakteriensuspension entnommen und deren Trübung in Plastikküvetten der Schichtdicke 1 cm in einem Gilford Spektrophotometer 260 bei 600 nm gemessen.

3.1.7. Herstellung von "Replika-Filtern" (nach Hanahan und Meselson, 1980)

Ein steriler Nitrocellulose-Filter wurde auf eine frische Agarplatte gelegt, anschließend umgedreht und erneut auf das Nährmedium gelegt. Danach wurden geeignete Aliquots an Zellen darauf ausplattiert und so lange bei 37°C inkubiert, bis Kolonien von etwa 0.1 mm Durchmesser gewachsen waren. Zur Herstellung von "Replika-Filtern" wurde der "Master"-Filter mit den Kolonien nach oben auf ein steriles Filterpapier gelegt und darauf ein frischer, angefeuchteter Nitrocellulose-Filter, der anschließend auf eine frische Agarplatte übertragen und dann bis zum Erscheinen deutlicher Kolonien bei 37°C inkubiert wurde.

"Replika"-Filter, die für Hybridisierungen verwendet werden sollten, wurden so lange bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien eine Größe von etwa 2 mm erreicht hatten. Anschließend wurden die Filter abgenommen und zur Amplifizierung der Plasmide auf chloramphenicolhaltige (200 µg/ml) LB-Agarplatten 24 Stunden lang inkubiert, danach lysiert und hybridisiert (vgl. dazu Kap. 3.5.2. Koloniehybridisierung).

3.1.8. Aufbewahrung von Genbanken

Aufbewahrung als eingefrorener Nitrocellulose-Filter (nach Hanahan und Meselson, 1980):

Zunächst wurde ein steriler Nitrocellulose-Filter auf eine ampicillin- (100 µg/ml) + glycerinhaltige (5%) LB-Agarplatte gelegt. Darauf wurden geeignete Aliquots an Zellen (z.B. in Form des transformierten Ligaseansatzes) ausplattiert und bis zum Erscheinen deutlicher Kolonien von etwa 0.1 mm Durchmesser bei 37°C bebrütet. Zur Gewinnung von "Replika"-Filter wurde der "Master"-Fil-

ter auf ein steriles, angefeuchtetes Whatman 3MM Papier gelegt und darauf ein zweiter, angefeuchteter Nitrocellulose-Filter. Diese beiden Filter wurden zusammen auf eine frische LB-Agarplatte (ampicillin- und glycerinhaltig) transferiert und bis zum Erkennen deutlicher Kolonien inkubiert. Jetzt wurden die beiden, nach wie vor aneinanderliegenden Filter von jeweils drei Lagen trockenen Whatman 3MM-Filter umgeben und darauf wurde eine, der Befeuchtung dienende Schicht nasser Whatman-Filter gelegt. Dieses "Sandwich" wurde in einen Gefrierbeutel gegeben, verschweißt und bei -80°C aufbewahrt.

Aufbewahrung als Ligaseansatz:

Aliquots der für die Erstellung der Genbank präparierten Ligaseansätze wurden transformiert und die Transformationsrate bestimmt. Nachdem die Komplexität der Genbank durch Untersuchung willkürlich ausgewählter Klone überprüft war, wurden die Ligaseansätze zu gleichen Teilen aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt.

Durch Transformationen eines geeigneten Aliquots des eingefrorenen Ligaseansatzes kann sehr schnell eine vollständige Genbank erhalten werden.

3.1.9. Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Bakterienstämme wurden auf Agarplatten mehrere Monate bei 4°C aufbewahrt. Für eine längere Lagerung wurden 2 ml einer Übernachtskultur mit 30% Glycerin versetzt und dann bei -80°C aufbewahrt.

3.2. RNA-POLYMERASE-AKTIVITÄTSTEST IN ROHEXTRAKTEN

Als Permeabilitätsmutanten werden solche Stämme definiert, deren RNA Polymeraseaktivität dieselbe Dosis-Wirkungs-Kurve der Rifampicinhemmung zeigt wie der Wildtyp, die allerdings auf höheren Rifampicinkonzentrationen zu wachsen vermögen (Tropschug, 1981). Der RNA Polymerasetest in Rohextrakten wurde in Anlehnung an Tropschug (1981) in einer etwas modifizierten Form durchgeführt.

Herstellung des Rohextraktes:

50 ml YT-Medium (8 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl) wurde mit 1 ml einer 1:50 verdünnten Übernachtskultur angeimpft und im Bakterienschüttler bei 37°C bis zu einer $A_{560} = 1.0$ wachsen gelasse. Anschließend wurden die Zellen 20 Minuten bei 10000 Upm und 4°C abzentrifugiert und der Bakterienniederschlag in 2 ml eiskaltem, sterilfiltriertem Aufschlußpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Mercaptoethanol, 2 mM PMSF, 25% Glycerin) aufgenommen und anschließend unter Verwendung der 5 ml Kammer in der "French Press" bei 1500 psi in zwei Durchläufen aufgeschlossen. Hierbei wurde eine Arbeitstemperatur von 4°C streng eingehalten (Kammer vor Gebrauch auf 4°C vorkühlen, Bakteriensuspension immer auf Eis halten).

Die aufgeschlossene Bakteriensuspension wurde 20 Minuten in der Sigma-Zentrifuge bei 12000 Upm und 4°C abzentrifugiert, der Niederschlag in 300 µl TE-Puffer aufgenommen und so im Aktivitätstest eingesetzt.

Durchführung des Tests:

Zunächst wurde der Inkubationsansatz folgender Zusammensetzung bei 4°C hergestellt (Gesamtvolumen 85 µl):

10.0 µl	0.5 mM Tris-HCl pH 7.9 (10^{-3} M DTT)
12.5 µl	0.1 M $MgCl_2$
10.0 µl	7.5 mM GTP
10.0 µl	7.5 mM CTP
10.0 µl	7.5 mM ATP
5.0 µl	2 mCi/ml [^{32}P] UTP
10.0 µl	2.0 mM KCl
12.5 µl	Kalbsthymus DNA (2.5 mg/ml)
5.0 µl	H ₂ O

Zu diesem Inkubationsansatz wurden entweder 10 µl H₂O oder das gleiche Volumen an Rifampicinlösungen verschiedener Konzentration (aus einer Stammlösung von 200 µg/ml H₂O) pipettiert, die Reaktion durch Zugabe von 30 µl Rohextrakt gestartet und der Ansatz 15 Minuten im 37°C Wasserbad inkubiert. Danach wurden aus jedem Ansatz 50 µl entnommen und auf die Startlinie eines 4 x 21 cm großen Streifens Whatman 3MM Chromatographiepapier aufgetragen. Nachdem die Proben eingetrocknet waren (etwa nach 20 Minuten bei Raumtemperatur), wurden die Chromatogramme durch aufsteigende Chromatographie (Laufstrecke 18 cm) in einem WASP-Fließmittel (Wasser : gesättigte Ammoniumsulfatlösung : iso-Propanol = 18 : 20 : 2, wobei die Lösung 5 mM EDTA enthielt) entwickelt. Die Chromatogramme wurden 30 Minuten unter Rotlicht getrocknet und danach in 4 x 1 cm große Querstreifen geschnitten, um die verschiedenen RNA-Produkte und das nicht eingebaute [^{32}P] UTP voneinander getrennt bestimmen zu können. Die Radioaktivität an der Auftragsstelle mit einem R_f -Wert zwischen -0.05 und 0.05 wird dabei den Polynukleotiden (RNA) zugeordnet (Johnston and McClure, 1976). Anschließend wurden die Streifen in Zählgläschen überführt, und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit [50 mg 1.4-bis-2-(5-Phenyl-oxazolyl)-benzol (POPOP)

und 4 g 2.5-Diphenyloxazol (PPO) pro 1 Liter Toluol] überführt und die Radioaktivität der einzelnen Proben in einem ISO CAP 300 Liquid Scintillation Counter bestimmt.

Alternativ zum Aufschluß der Zellen mit der "French Press" kann der Aufschluß auch mittels Ultraschall-Behandlung durchgeführt werden. Hierfür werden 10 ml der bis $A_{660} = 1.0$ gewachsenen Zellen abzentrifugiert (SS34 Rotor, 10000 Upm, 20 Minuten, 4°C) und der Niederschlag in 0.3 ml Aufschlußpuffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 100 mM EDTA, 10 mM Mercaptoethanol) aufgenommen. Danach wird die Bakteriensuspension in ein vorgekühltes Reagenzglas überführt und durch eine 2 x 20 Sekunden lange Beschallung mit der Mikrospritze des Branson Sonifier (Stellung 1.5) aufgeschlossen. Die Beschallung hat im Eiswasserbad stattzufinden, wobei zwischen den beiden Beschallungen, zur Vermeidung einer zu starken Erwärmung der Suspension, eine 1 minutige Abkühlung eingelegt werden soll.

3.3. ISOLIERUNG VON DNA

3.3.1. Isolierung von zellulärer DNA aus *E.coli*

Die Isolierung von vollständig protein- und auch RNA-freier DNA aus *E.coli* Zellen erfolgte in einer modifizierten Form nach Marmur (1961).

1 Liter vorgewärmtes L-Broth Medium wurde mit 20 ml einer 1:50 verdünnten Übernachtskultur des entsprechenden Stammes angeimpft und bei 37°C im Bakterienschüttler bis zu einer $A_{600} = 0.8-1.0$ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Eisbad auf 4°C abgekühlt und durch Zentrifugation geerntet (Sorvall GS3, 8000 Upm, 4°C, 30 Minuten). Der Bakterienniederschlag wurde in 100 ml eis-

kaltem Waschpuffer (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 8.0) resuspendiert und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Der dabei erhaltene Niederschlag wurde in 25 ml LysozymbLösung (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 8.0, Lysozym 2 mg/ml) aufgenommen und 1 Stunde unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die bereits hochviskose Suspension wurde mit 5 ml 10% SDS-Lösung versetzt und 10 Minuten im Wasserbad auf 60°C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde Natriumperchlorat bis zu einer Endkonzentration von 1 M zugegeben und 5 Minuten leicht geschüttelt. Die dabei ausgefallenen Proteine wurden durch Zugabe von 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) und 30minütigem Schütteln (am besten im Scheidetrichter) bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (SS34 Rotor, 10000 Upm, Raumtemperatur, 5 Minuten) entfernt. Die obere Phase (enthält die DNA) wurde abgenommen und mit 2 Volumenteilen, -20°C kaltem Ethanol vorsichtig überschichtet. Die in der Zwischenphase ausgeflockte, hochmolekulare DNA wurde durch Drehen mit einem angerauchten Glasstab aufgewickelt. Die aufgewickelte DNA wurde in 20 ml 70% Ethanol 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen (die DNA verbleibt am Glasstab), danach der überschüssige Alkohol durch Ausdrücken an der Gefäßwand entfernt und die DNA in 10 ml Proteinase K-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 0.25 mg/ml Proteinase K). Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C erfolgten Extraktionen mit gleichen Volumina an Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Nach jeder Extraktion erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 10000 Upm im SS34 Rotor bei Raumtemperatur, wobei danach jedes Mal die obere Phase vorsichtig abgenommen wurde. Anschließend wurde der abgenommenen Phase Natriumacetat (aus einer 3 M Stammlösung pH 5.2) bis zu einer Endkonzentration von 0.25 M zugesetzt und diese erneut mit 2 Volumenteilen -20°C kaltem Ethanol überschichtet. Die

dabei in der Zwischenschicht ausgefallene DNA wurde wieder wie oben beschrieben aufgewickelt und danach in 6 ml RNase-Puffer (1xSSC-Puffer, 1000 U RNase T1, 150 µg/ml RNase A) gelöst. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde aus einer Stammlösung Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 0.2 mg/ml zugegeben und die Inkubation für 2 Stunden fortgesetzt. Anschließend wurde noch einmal eine Phenolisierung und Ethanolfällung analog der obigen Beschreibung durchgeführt, die jetzt völlig farblose DNA in 5 ml TE-Puffer aufgenommen und über Nacht gegen 2x 2 Liter TE-Puffer bei 4°C dialysiert. Die DNA wurde in 200 µl Aliquots aufgeteilt und bei 4°C aufbewahrt.

3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA über Dichtegradienten-zentrifugation (nach Maniatis *et al.*, 1982)

Anzucht:

1 Liter vorgewärmtes, das entsprechende Antibiotikum enthaltende L-Broth Medium wurde mit 5 ml Übernachtskultur des plasmidhaltigen Bakterienstammes angeimpft und im Bakterienschüttler bis zu einer Zelldichte von $A_{580} = 0.8$ inkubiert. Zur Stimulierung der Plasmid-replikation wurde zu diesem Zeitpunkt Chloramphenicol (34 mg/ml Ethanol) bis zu einer Endkonzentration von 170 µg/ml zugesetzt und die Inkubation über Nacht bei 37°C fortgesetzt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet (7000 Upm, 4°C, 30 Minuten).

Lyse der Zellen:

Der Bakterienniederschlag wurde in insgesamt 12 ml eiskalter Sucrozelösung (25% Sucrose in 50 mM Tris-HCl pH 8.0) suspendiert und zu gleichen Teilen in vorgekühlte Sorvall SS34 Zentrifugenbecher überführt. Zur Lyse der Bakterien wurden insgesamt 2 ml frisch zu-

bereitete Lysozymlösung (5 mg/ml in 0.25 M Tris-HCl pH 8.0) zugeben und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 4 ml 0.25 M EDTA-Lösung (pH 8.0) zugefügt und die Inkubation für weitere 10 Minuten bei 4°C fortgesetzt. Nach Zugabe von 16 ml Lysis-Mix (0.2% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 60 mM EDTA-Lösung pH 8.0), und erneut 10minütiger Inkubation bei 4°C entstand eine hochviskose Lösung, die abzentrifugiert wurde (Sorvall SS34, 20000 Upm, 4°C, 60 Minuten). Das klare, die DNA enthaltende Lysat wurde von dem äußerst "weichen" Niederschlag abdekantiert, mit 0.95 g CsCl + 80 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 1 ml Überstand versetzt und in polyallomere Zentrifugenröhrchen (Beckman, 13 x 51 mm) eingeschweißt. Die Zentrifugation wurde mit 47000 Upm bei 18°C für 18 Stunden durchgeführt.

Isolierung der superhelikalen Plasmid-DNA:

Nach der Zentrifugation konnte die superhelikale Form der Plasmid-DNA in etwa Mitte des Röhrchens durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht werden. Mit einer 1 ml-Plastikspritze wurde in Höhe der Plasmid-Bande eingestochen und diese entfernt. Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde 5x mit einer H₂O gesättigten 1-Butanol-Lösung extrahiert und die nun farblose DNA-Lösung gegen 2x 5 Liter TE-Puffer dialysiert. Die Konzentration der DNA-Lösung und deren Güte wurde durch Bestimmung der Extinktion bei 260 und 280 nm ermittelt. Darüberhinaus wurde die Reinheit der Präparation auch durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die DNA-Lösung wurde in 0.2 ml Aliquots aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt.

3.3.3. Größenselektive Isolierung partiell gespaltener, zellulärer DNA über Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation (nach Maniatis *et al.*, 1982)

a) Erarbeitung geeigneter Bedingungen für die partielle Spaltung chromosomaler DNA:

10 µg chromosomale DNA wurden mit dem entsprechenden Inkubationspuffer in einem Gesamtvolumen von 150 µl versetzt. Davon wurden 30 µl in das Eppendorfgefäß Nr.1 und jeweils 15 µl in die Eppendorfgefäße 2-9 pipettiert. 4 Units des gewünschten Restriktionsenzym mit einer 4bp-Erkennungssequenz wurden in Gefäß 1 pipettiert, gut gemischt und davon wieder 15 µl in Gefäß 2. Diese Verdünnungsreihe wurde bis einschließlich Gefäß 8 durchgeführt (Gefäß 9 diente der Kontrolle), dem sich eine 1stündige Inkubation bei 37°C anschloß. Die Reaktion wurde durch 5minutige Erhitzung auf 65°C gestoppt. Eine Analyse der hydrolysierten DNA erfolgte durch Elektrophorese in einem 0.7% Agarosegel in Anwesenheit geeigneter DNA Längenstandards (Lambda DNA, gespalten mit *HindIII*), wobei die Elektrophorese bei 2V/cm durchgeführt wurde.

Nach Anfärbung des Gels mit Ethidiumbromid wurde dieses unter UV-Licht photographiert. Anschließend wurde durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der einzelnen Spuren die Enzymmenge bestimmt, bei der die Hauptmenge an DNA im gewünschten Größenbereich entstand.

b) Gewinnung partiell gespaltener DNA im größeren Maßstab:

200 µg DNA wurden unter genauer Einhaltung der Bedingungen, die den Hauptanteil an DNA im gewünschten Größenbereich ergab, mit dem entsprechenden Restriktionsenzym inkubiert, wobei die DNA-Konzen-

tration dem des Vorversuchs entsprach. Zur Überprüfung der korrekten Größenverteilung wurde anschließend 1 µg der hydrolysierten DNA über ein 0.7%iges Agarosegel analysiert.

Die Gesamtmenge der gespaltenen DNA wurde nun mit gleichem Volumen an Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und anschließend mit Ethanol präzipitiert (in Anwesenheit von 0.3 M Natriumacetat pH 5.2) und wieder in 500 µl TE-Puffer aufgenommen.

Danach wurde ein 35 ml, 15-40% Sucroседichtegradient in einem Beckman polyallomeren Zentrifugenbecher hergestellt, wobei die Sucroселösung in einer aus 1M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 und 5 mM EDTA enthaltende Pufferlösung hergestellt wurde. Der Gradient wurde mit der vorher auf 70°C erhitzten DNA beladen und danach zentrifugiert (26000 Upm, 24 Stunden, 20°C).

Der Boden des Zentrifugenröhrchens wurde mithilfe eines Gradientenanstechgerätes angestoßen und 0.5 ml Portionen gesammelt. Von jeder 3. Fraktion wurde, in Anwesenheit eines DNA Längenstandards, ein 10 µl Aliquot über ein 0.7% Agarosegel analysiert. Hierbei wurde die Salz- und Sucrosekonzentration des Markers der der Proben angepaßt. Nach Auswertung des Gels wurden die Fraktionen, welche dem gewünschten Größenbereich entsprachen, vereinigt und über Nacht gegen 2x 4 Liter TE-Puffer dialysiert. Danach wurde die DNA in Anwesenheit von 0.25 M Natriumacetat (pH 5.2) mit 2 Volumina Ethanol präzipitiert und anschließend in so viel TE-Puffer aufgenommen, daß eine DNA Konzentration von etwa 0.2 mg/ml erhalten wurde. Ein 0.5 µg Aliquot wurde noch einmal über ein 0.7% Agarosegel analysiert und danach die DNA in der Ligasereaktion eingesetzt.

3.3.4. Isolierung von M13 RF DNA (nach Messing, 1983)

a) Präparation der M13 RF DNA aus einzelsträngiger DNA:

Kompetente JM103 Zellen wurden mit 10 ng einzelsträngiger M13 mp 10 DNA transformiert. Mit einer sterilen Impföse wurden Einzelkolonien gepickt und mit jeder Kolonie 1 ml frische JM103 Zellen (erhalten durch 1:20 Verdünnung einer Übernachtskultur) beimpft. Es folgte eine 5 Stunden lange Inkubation bei 37°C im Bakterien-schüttler. Anschließend wurde 5 Minuten in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Danach wurden 100 ml vorgewärmtes YT Medium mit 1 ml Überstand und mit 1 ml frischer, exponentiell wachsender JM103 Zellen versetzt und erneut 4 Stunden bei 37° unter Schütteln inkubiert. Die infizierten Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (Sorvall SS34 Rotor, 8000 Upm, 4°C, 15 Minuten) und aus dem Niederschlag analog der Plasmid-Minipräparation die RF DNA isoliert. Aus einer 100 ml Kultur betrug die DNA Ausbeute etwa 50 µg.

Größere Mengen hochreiner M13 mp 10 RF DNA wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Zinder und Boeke (1982) durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen.

3.3.5. Isolierung einzelsträngiger M13 Phagen-DNA (Messing, 1983)

Nach Inkubation über Nacht bilden die transformierten JM103 Zellen weiße (wenn rekombinant) oder blaue (wenn Wildtyp) Plaques, die als Regionen verlangsamten Wachstums zu verstehen sind. Die Bakteriophagen aus einem Plaque wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, in 1 ml YT-Medium übertragen und nach Zugabe von 10 µl exponentiell wachsender JM103 Zellen etwa 4-5 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten in

einer Eppendorffzentrifuge wurden 0.8 ml des Überstands mit 200 µl PEG-Lösung (20% PEG 6000, 2.5 M NaCl) versetzt, leicht geschüttelt und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch die sich anschließende Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge, 5 Minuten) konnten die Phagen als Präzipitat geerntet und der Überstand verworfen werden. Danach wurde erneut für 2 Minuten zentrifugiert, die restlichen Spuren des Überstands mit einer Pasteurpipette und durch vorsichtiges Abwischen mit einem Saugpapier entfernt und anschließend der Phagenniederschlag in 100 µl TES-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) suspendiert. Nach Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde die Phagen DNA durch Ethanol-fällung, in Anwesenheit von 0.25 M Natriumacetat pH 5.2, geerntet. Der DNA Niederschlag wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

3.3.6. Reinigung von Oligonukleotiden durch Elektrophorese über Polyacrylamidgele

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden nach dem "Phosphoramidit-Verfahren" in einem vollautomatischen "DNA-Synthesizer" (Modell 380 A, Applied Biosystems) hergestellt. Die Synthesen wurden von T. Dörper und R. Mertz durchgeführt.

Das vom Syntheseautomaten gelieferte Oligonukleotid ist ein Gemisch, das neben der gewünschten Verbindung noch eine Vielzahl kürzerer Oligonukleotide und Spaltprodukte enthält, die entfernt werden müssen. Das erhaltene Reaktionsgemisch (Rohausbeute etwa 100 A₂₆₀) wurde in 4 Aliquots aufgeteilt und lyophilisiert. 1 Aliquot wurde in 50 µl Wasser aufgenommen und dazu 50 µl eines Formamid-Farbstoffgemisches (98% Formamid, 10 mM EDTA, 0.2% Bromphenol-

blau. 0.2% Xylencyanol) gegeben. Die Reinigung geschah durch Elektrophorese in einem 16% Polyacrylamid-8 M Harnstoffgel (Sequenzgel) mit 1x TBE als Laufpuffer. Die Maße des Gels waren 30 x 15 x 0.05 cm, die Spurbreite 0.5 cm. Nach Beendigung der Vorelektrophorese (20 V/cm, 60 °C, 30 Minuten) wurden die Taschen gründlich gespült und in diese die vorher kurz (2 Minuten) aufgekochten Proben pipettiert. Die Elektrophorese wurde unter den obig beschriebenen Bedingungen so lange fortgesetzt, bis das Bromphenolblau das Gelende erreicht hatte.

Die Oligonukleotide wurden nach der Elektrophorese durch UV-Fluoreszenzlöschung sichtbar gemacht. Hierfür wurde das Gel von der Glasplatte genommen und auf eine mit Haushaltsfolie umschichteten Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatte gelegt, die mit einem bei 254 nm absorbierenden Fluoreszenzfarbstoff beschichtet ist (Merck, Kieselgel 60, F 254). Das Gel wurde von oben mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Dabei waren die Oligonukleotide durch ihre Fluoreszenzauslöschung als dunkle Banden gut erkennbar (Fig. 1). Die oberste Bande, die dem gewünschten Produkt entspricht, wurde mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in eine 1 ml Pipettenspitze, die an der Spitze zugeschmolzen und mit silanisierter Glaswolle verstopft war, überführt. Die Gelstückchen wurden in dieser Spitze mit einem Glasstab zerkleinert und 600 µl Wasser zugesetzt. Die obere Öffnung der Pipettenspitze wurde fest mit Parafilm verschlossen und die DNA durch Schütteln über Nacht bei 37°C aus dem Gel eluiert (Maxam und Gilbert, 1980). Dann wurde die zugeschmolzene Spitze abgeschnitten und die Lösung durch die Glaswolle hindurch in ein Eppendorfgefäß abzentrifugiert (Eppendorfsentrifuge, 2 Minuten). Zu der nun partikelfreien DNA-Lösung wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.2, 1/10 Volumen 0.1 M MgCl₂

und 2.5 Volumina Ethanol pipettiert. Die Fällung der DNA erfolgte über Nacht bei -80°C , anschließend wurde die Lösung bei 20000 Upm (Sorvall SS34 Rotor, 4°C , 60 Minuten) abzentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde in 100 μl 0.3 M Natriumacetat pH 5.2 + 10 mM MgCl_2 aufgenommen und die Ethanolfällung unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Der so erhaltene DNA-Niederschlag wurde nach dem Trocknen in 200 μl TE-Puffer gelöst und die Konzentration der DNA durch Messen der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Aus der optischen Dichte kann mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten und der Fragmentzusammensetzung die molare Konzentration abgeleitet werden. Extinktionskoeffizienten für 260 nm und 1 $\mu\text{M/ml}$: dT (8.8), dG (11.8), dA (15.0), dC (7.4).



17er

Fig.1 Über ein 16% Sequenzgel gereinigtes Oligonukleotid

Diese Abbildung zeigt ein nach erfolgter Elektrophorese durch UV-Fluoreszenzlöschung sichtbar gemachtes, 17 Nukleotide langes Oligonukleotid (Näheres im Text).

3.3.7. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

a) DNA-Fragmentisolierung über DEAE-Membranfilter

Ein sehr schnelles und effizientes Verfahren zur Isolierung von DNA-Fragmenten kleiner und mittlerer Grösse ist die von Winberg und Hammarskjöld (1980) beschriebene Membranfiltertechnik. Die über ein Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht sichtbar gemacht und unmittelbar vor dem betreffenden Fragment (in Laufrichtung) mit einer Rasierklinge ein Schnitt gesetzt, in welchem ein Stück vorbereitete DEAE-Zellulosemembran (NA-45, Schleicher & Schüll) eingesetzt wurde. Die Elektrophorese wurde fortgesetzt, wobei die DNA auf die Membran wanderte und dort festgehalten wurde. Das aus dem Gel entfernte, rot fluoreszierende Membranstückchen wurde mit NET-Puffer (150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0) gründlich gewaschen, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit so viel NET-Hochsalzpuffer (1M NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0) überschichtet, daß die Membran vollständig bedeckt war. Zur Eluierung der DNA wurde nun 45 Minuten bei 65°C inkubiert, das DNA-Eluat in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und das Ethidiumbromid durch Extraktion mit dreifachem Volumen H₂O-gesättigtem n-Butanol entfernt. Zur Fällung der DNA wurden 2.5 Volumina -20°C 95% Ethanol zugegeben, das Eppendorfgefäß 30 Minuten bei -80°C belassen und anschließend zentrifugiert (12000 Upm, 4°C, 20 Minuten). Der getrocknete DNA-Niederschlag wurde zur Erniedrigung der Salzkonzentration in 300 µl 0.3 M Natriumacetat pH 5.2 aufgenommen und erneut eine Ethanol-fällung durchgeführt. Der getrocknete DNA-Niederschlag wurde, je nach zu erwartender Ausbeute in 10 - 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

b) DNA-Fragmentisolierung aus niedrigschmelzender Agarose
(nach Maniatis *et al.*, 1982, modifiziert)

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente über niedrigschmelzende Agarose Gelelektrophorese (durchgeführt bei 4°C) wurden die interessierenden Banden mit langwelligem UV-Licht sichtbar gemacht, diese mit einem Skalpell knapp herausgeschnitten und in Eppendorffgefäße überführt. Zu jedem Gelstückchen wurden nun etwa 2 Volumina TE-Puffer zugegeben und die Agarose durch 10minütiges Erhitzen auf 65°C geschmolzen. Anschließend wurden bei Raumtemperatur Extraktionen mit gleichen Volumina an Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt. Der die DNA enthaltende Überstand wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 2.5 Volumina -20°C 95% Ethanol versetzt und für 30 Minuten auf -80°C gestellt. Die DNA wurde danach abzentrifugiert (12000 Upm, 4°C, 20 Minuten) und der DNA-Niederschlag mit eiskaltem 80% Ethanol gewaschen. Nach Trocknen der DNA wurde diese in 10 - 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

c) DNA-Fragmentisolierung durch Elektroelution

Wurden größere Mengen eines DNA-Fragments benötigt oder handelte sich um ein relativ großes DNA-Fragment, erwies sich die Elektroelution mit Dialysemembran als Verfahren mit der besten Ausbeute. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wurden die interessierenden Banden mit langwelligem UV-Licht sichtbar gemacht. Mit einem scharfen Skalpell wurde unmittelbar vor der interessierenden Bande ein etwa 3 mm breiter Streifen herausgeschnitten und in diesen in der Weise eine Dialysemembran eingezogen, daß der entstandene Ausschnitt nach unten und nach hinten (in Laufrichtung) dicht abgeschlossen war. Jetzt wurde das

präparierte Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und diese mit so viel Lauffuffer (1x TBE) gefüllt, daß das Gel gerade noch nicht von Puffer überflutet war. In dem an einer Seite von der Dialysemembran begrenzten Ausschnitt wurden etwa 0.5 ml 1/2x TBE-Puffer pipettiert und die Elektrophorese für 5 Minuten fortgesetzt. Nach dieser Zeit konnte durch Betrachtung unter langwelligem UV-Licht die an die Dialysemembran gebundene DNA lokalisiert werden. Nun wurden die Phasen umgepolt und die Elektrophorese für 1 Minute unter diesen Bedingungen fortgesetzt. Wiederum mithilfe langwelligem UV-Lichts wurde die sich gerade von der Membran loslösende DNA mit einer Pipette aufgesaugt. Bei größeren DNA-Mengen mußte dieser Vorgang mehrmals wiederholt werden.

Zur Entfernung des Ethidiumbromids und gleichzeitiger Einengung des Volumens wurde die DNA-haltige Lösung mit gleichem Volumen an 2-Butanol extrahiert. Anschließend wurde eine Extraktion mit Phenol/Chloroform durchgeführt, der sich eine Ethanolfällung anschloß. Das getrocknete DNA-Präzipitat wurde in so viel TE-Puffer aufgenommen, daß sich eine DNA-Konzentration von etwa 0.2 mg/ml ergab.

3.3.8. Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen (Maxam and Gilbert, 1980)

Das im folgenden beschriebene Verfahren wurde für die Isolierung von DNA-Fragmenten der Größen 100 - 300 bp verwendet.

Das DNA-Fragmentgemisch wurde über ein 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel nach Beendigung des Laufes 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (0.5 µg/ml H₂O) geschwenkt. Mit langwelligem UV-Licht wurden die interessierenden Banden lokalisiert und mit einem scharfen Skalpell herausgeschnitten. Die gewonnenen Gelstückchen wurden mit dem Skalpell fein zerkleinert und in blaue

Pipettenspitzen, die unten zugeschmolzen und mit silamisierte Glaswolle fest verstopft waren, überführt. Anschließend wurden 300 µl Elutionspuffer (0.5 M Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat) zugegeben und über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln eluiert (Maxam und Gilbert, 1980). Am nächsten Tag wurde die zugeschmolzene Spitze abgeschnitten und die DNA-haltige Lösung durch die Glaswolle zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, 2 Minuten). Anschließend wurde die DNA aus der Salzlösung mit 2,5 Volumina eiskaltem 95% Ethanol präzipitiert (30 Minuten bei -80°C, danach Zentrifugation bei 12000 Upm, 4°C, 20 Minuten). Nach Trocknung der DNA wurde diese in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und zur Entfernung der Ammoniumionen eine nochmalige Fällung aus Natriumacetat durchgeführt (Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.2, 2 Volumina Ethanol, 30 Minuten bei -80°C, danach Zentrifugation wie oben). Nach der Zentrifugation wurde der DNA-Niederschlag mit eiskaltem 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 - 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.3.9. Reinigung und Konzentrierung von DNA

Zur Entfernung von Proteinen nach enzymatischen Reaktionen oder generell zur Sicherstellung der Abwesenheit von Nukleasen wurde die DNA vor der Verwendung für weitere enzymatische Reaktionen mit gleichen Volumina an Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Zwischen den einzelnen Extraktionsschritten erfolgte eine 2minütige Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge bei Raumtemperatur, bei größeren Mengen im Sorvall SS34 Rotor, wobei jeweils die obere Phase die DNA-haltige war.

Die übliche Konzentrierung von DNA-Lösungen erfolgte durch Ethanol-fällung: Hierbei wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 2 Volumina -20°C kaltem 95% Ethanol versetzt, dieses Gemisch für etwa 30 Minuten bei -80°C oder über Nacht bei -20°C belassen und danach abzentrifugiert (12000 Upm, 20 Minuten, 4°C). Der erhaltene Niederschlag wurde mit eiskaltem 80% Ethanol gewaschen und die DNA nach dem Trocknen in TE-Puffer aufgenommen.

Hochverdünnte DNA-Lösungen wurden zu Konzentrierungszwecken zunächst mehrmals mit 2-Butanol extrahiert. Hierbei wurde die DNA-Lösung mit jeweils gleichem Volumen an n-Butanol versetzt, gut durchmischt, 2 Minuten in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert und dann die obere Phase verworfen. Anschließend wurde noch eine Ethanol-fällung durchgeführt (vgl. oben).

Die Konzentration der DNA wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm gegen den verwendeten Puffer bestimmt ($A_{260} = 1$ entspricht 50 µg DNA/ml).

3.4. ENZYMATISCHE REAKTIONEN AN DNA

3.4.1. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen (nach Angaben des Herstellers)

Zur Spaltung der DNA wurden DNA-Konzentrationen zwischen 40 und 100 µg/ml eingesetzt und durch Zugabe der entsprechenden zehnfach konzentrierten Puffer wurden die für das verwendete Restriktionsenzym erforderliche Salzkonzentration eingestellt.

Die Enzymreaktionen wurden hauptsächlich gemäß der Einteilung der von Maniatis *et al.* (1982) in Puffern mit niedriger, mittlerer und hoher Ionenstärke durchgeführt:

Puffer:	NaCl	Tris-HCl pH 7.5	MgCl ₂	DTT
niedrig	0 mM	10 mM	10 mM	1 mM
mittel	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
hoch	100 mM	50 mM	10 mM	1 mM

Bei Enzymen, die gemäß der Angaben des Herstellers stark von diesen Universalbedingungen abweichen, wurden die vom Hersteller empfohlenen Bedingungen eingesetzt.

Für die Spaltung der DNA wurden 1-10 Einheiten pro 1 µg DNA eingesetzt und bei der angegebenen Temperatur 1-2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion auf verschieden Weise beendet:

- a) durch 10minütiges Erhitzen auf 65°C
- b) durch Phenolisieren
- c) durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 100 mM)
- d) durch Zugabe von 1/10 Volumen Stopppuffer (vor der Elektrophorese)

10x Stopppuffer: 0.25% Bromphenolblau
 0.25% Xylencyanol
 0.1 M EDTA
 20% Ficoll 400

3.4.2. Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase (nach Angaben des Herstellers)

Durch Hydrolyse der DNA mit Restriktionsenzymen entsteht am 5'-Ende des Fragments ein 5'-Phosphat, am 3'-Ende eine Hydroxylgruppe. Bei Klonierungen ist es jedoch wünschenswert, auch am 5'-Ende eine freie OH-Gruppe zu haben, um eine Rezirkularisierung des linearisierten Vektors, welche den Einbau exogener DNA stark beeinträchtigen würde, zu verhindern. Auch für 5'-Endmarkierungen von DNA-Fragmenten ist eine vorherige Erzeugung einer OH-Gruppe erforderlich. Eine Abspaltung des 5'-Phosphates wird durch die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm katalysiert.

Im Standardansatz wurden 2 µg DNA vollständig gespalten, danach phenolisiert und anschließend die DNA mit Ethanol präzipitiert. Der DNA-Niederschlag wurde in 20 µl 50 mM Tris-HCl pH 8.0 aufgenommen, mit 1 Einheit alkalische Phosphatase/µg DNA versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung und Entfernung des Enzyms wurde der Inkubationsansatz zunächst für 10 Minuten auf 65°C erhitzt, danach phenolisiert und mit Ethanol die DNA präzipitiert. Der DNA-Niederschlag wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und für weitere Experimente verwendet.

3.4.3. Auffüllen von versetzten Enden mit Klenow-Polymerase (nach Maniatis *et al.*, 1982)

DNA-Restriktionsfragmente mit 5'-überhängenden Enden können mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA Polymerase zu glatten Enden überführt werden, welche dann für "blunt end"-Ligierungen oder Linker-Additionen verwendet werden können.

Zu 1 μg gespaltener DNA wurden 2 μl 10x Polymerase-Puffer, 2 μl dNTP-Mix (0.5 mM) und 1 Einheit Klenow-Polymerase zugegeben, mit H_2O auf 20 μl Gesamtvolumen aufgefüllt und der Ansatz dann 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5minutige Inkubation bei 65°C beendet und das Enzym durch Phenolextraktion entfernt. Nach Fällung der DNA mit Ethanol wurde der DNA-Niederschlag in 10 μl TE-Puffer aufgenommen.

10x Polymerase-Puffer: 70 mM Tris-HCl pH 7.5, 70 mM MgCl_2 ,
100 mM DTT, 1 mM EDTA

3.4.4. [^{32}P]-Markierung von Oligonukleotiden mit T4 Polynukleotidkinase (nach Maxam and Gilbert, 1980, modifiziert)

Oligonukleotide mit einer freien 5'-OH-Gruppe können durch Phosphorylierung dieser Position mittels T4 Polynukleotidkinase und [γ - ^{32}P] ATP radioaktiv markiert werden. Der typische Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 10 μl : 2.0 μM Oligonukleotide, 67 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM DTT, 3.0 μM [γ - ^{32}P] ATP und 4 Units T4 Polynukleotidkinase. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 μl 0.25 M EDTA gestoppt. Nicht eingebautes [γ - ^{32}P] ATP wurde vom Oligonukleotid durch Chromatographie über eine Ionenaustauschsäule (DE-52, Whatman) abgetrennt. Hierfür wurde zunächst eine 1 ml Plastikspritze mit einer Suspension an DE-52 (aufgenommen in 0.2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) so weit gefüllt, daß sich ein Bettvolumen von etwa 0.5 ml ergab und die Säule danach mit 2 ml TE-Puffer äquilibriert. Die Kinase-Reaktion wurde mit TE-Puffer auf 50 μl verdünnt, auf die Säule gegeben und diese, zur Entfernung des nicht eingebauten [γ - ^{32}P] ATP, 4x mit 0.5 ml 0.2 M NaCl/TE-Puffer gewaschen. Dieses geschah durch kurzzeitige Zentri-

fugation (1 Minute) der als Säule dienenden Plastikspritze. Das noch an den Austauscher gebundene, markierte Oligonukleotid wurde durch 2 0.5 ml-Aliquots 0.5 M NaCl/TE-Puffer mittels Zentrifugation (1 Minute) eluiert und konnte direkt als Hybridisierungsprobe verwendet werden.

3.4.5. Verkürzung von DNA-Fragmenten mit ExonukleaseIII

+ Nuklease S1 (nach Henikoff, 1984, modifiziert)

Diese Technik eignet sich für die Herstellung von Deletionen an DNA-Fragmenten und anschließender Konstruktion von Deletionsklonen. Zum partiellen Abbau des mit einem Restriktionsenzym gespaltenen DNA-Fragments wird zunächst ExonukleaseIII, welches 3'Enden von glatten und 5'überhängenden Enden sukzessive abbaut, und danach Nuklease S1, welches die 5'überhängenden Einzelstränge entfernt, eingesetzt. Um eine Familie an deletierten Fragmenten zu erhalten, werden nach der ExonukleaseIII-Behandlung in definierten Zeitabständen Aliquots entnommen, mit Nuklease S1 und Klenow-Polymerase behandelt und danach in die kompatible Restriktionsschnittstelle eines Vektors kloniert.

Die im folgenden beschriebenen Bedingungen wurden so gewählt, daß pro Minute etwa 200 Basen von der ExonukleaseIII abgebaut wurden: Zu 5 µg linearisierter DNA wurden 10 µl 5x ExoIII-Puffer gegeben, mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden 75 Einheiten ExonukleaseIII pro pMol 3'reserves Ende hinzupipettiert, schnell gemischt und bei 37°C weiterinkubiert. In 30 Sekunden-Abständen wurden 2.5 µl Aliquots entnommen, mit 5 µl H₂O vermischt und zur Enzyminaktivierung sofort für 10 Minuten bei 65°C inkubiert und danach auf Eis gestellt.

Anschließend wurden zu jeder Probe 12.5 µl 2x Sl-Puffer und 5 Einheiten Nuklease Sl pipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktionen durch Zugabe von 5 µl 0.8 M Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 80 mM MgCl₂ gestoppt.

Das Ausmaß der Deletionen wurde durch Agarose-Gelelektrophorese eines 7 µl-Aliquots unter Beisein eines DNA-Längenstandards überprüft und mit den interessierenden Proben weitergearbeitet.

Zu den restlichen 23 µl wurden 2 µl einer 0.125 mM dNTP-Mischung und 5 Einheiten der Klenow-Polymerase pipettiert und anschließend für 2 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde zur Inaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 65°C inkubiert und unter Erhöhung des Volumens auf 100 µl die DNA mit Ethanol präzipitiert.

Zum DNA-Niederschlag wurden 4 µl 10x Ligasepuffer, 1 Einheit T4 DNA-Ligase pipettiert, mit H₂O das Volumen auf 40 µl erhöht und über Nacht bei 12°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 200 µl kompetente JM83 Zellen mit 10 µl jedes Ligaseansatzes transformiert und in geeigneten Aliquots auf Antibiotika- + X-Gal-haltige L-Broth Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5x ExoIII-Puffer: 330 mM Tris-HCl pH 8.0, 3.3 mM MgCl₂
 2x Sl-Puffer: 2 mM Natriumacetat pH 4.6, 500 mM NaCl,
 2 mM ZnSO₄, 10% Glycerin
 10x Ligasepuffer: 0.5 M Tris-HCl pH 7.6, 0.1 M MgCl₂,
 10 mM ATP, 10 mM DTT

3.4.6. Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch T4 DNA-Ligase

Die Verknüpfung von linearisierter Vektor-DNA mit exogener DNA wird durch die T4 DNA-Ligase bewerkstelligt. Wichtige Parameter in der Ligasereaktion sind die Gesamtkonzentration an DNA sowie das

molare Verhältnis von Vektor zu Insertion. Die Einstellung dieser Parameter erfolgte gemäß den Berechnungen von Dugaiczky (1975). Die Ligasereaktionen wurden meistens in einem Volumen von 10-20 μ l, bei einer DNA-Gesamtkonzentration 0.5-1 μ g durchgeführt. Die Inkubationslösung enthielt 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT und 1 mM ATP. Durch Zugabe von 1 Einheit T4 DNA-Ligase wurde die Reaktion gestartet und bei 12°C 14 Stunden lang inkubiert.

3.4.7. [³²P]-Markierung von DNA durch Nick-Translation

In einem als Nick-Translation bezeichnetem Verfahren wird eine [³²P]-Markierung von doppelsträngiger DNA durch Zugabe von DNaseI, DNA PolymeraseI, α -[³²P] dCTP bei gleichzeitiger Anwesenheit der übrigen, nicht-radioaktiven Nukleotide erreicht (Rigby *et al.* 1977).

Zur Markierung von DNA-Fragmenten oder von Plasmid-DNA werden üblicherweise 50 μ Ci α -[³²P] dCTP (3000 Ci/mmol) eingesetzt. Im Standardansatz pipettiert man in einem Gesamtvolumen von 20 μ l bei 4°C:

2 μ g DNA
 2 μ l 10x Nicktranslationspuffer (0.7 M Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M MgCl₂, 10 mM DTT, 200 μ M dATP, dGTP, dTTP)
 2 μ l DNaseI (200 pg)
 1 μ l DNA Polymerase I aus *E. coli* (10 U)
 x μ l α -[³²P] dCTP (50 μ Ci)
 x μ l H₂O ad 20 μ l

Das Gemisch wurde 60 Minuten bei 16°C inkubiert, anschließend die Reaktion durch Zugabe von 1 μ l 0.5 M EDTA abgestoppt. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte über eine Sephadex G 50-Säule. Hierfür wurde eine sterile, am unteren Ende mit silanisierter Glaswolle verstopfte Pasteurpipette mit Sephadex G 50 fine gefüllt und diese mit 5 ml TE-Puffer äquilibriert. Danach wurde das radioaktive Gemisch aufgetragen und durch Elution mit

TE-Puffer Fraktionen zu je 100 µl in sterilen Eppendorfgefäßen aufgefangen und diejenigen Fraktionen ermittelt, welche die markierte DNA enthielten. Bei konstanten Versuchsbedingungen waren dies immer die Fraktionen 7-9. Diese wurden sodann vereinigt und unter Einsatz eines Aliquots (1/100 des Gesamtvolumens) im Szintillationszähler die Höhe des radioaktiven Einbaus bestimmt, der bei superhelikaler DNA $1-5 \times 10^7$ cpm/µg DNA, bei DNA-Fragmenten $1-5 \times 10^6$ cpm/µg DNA betrug.

3.5. IDENTIFIZIERUNG REKOMBINANTER DNA

3.5.1. Schnellverfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA

Alkalischer Aufschluß (nach Maniatis *et al.*, 1982):

5 ml L-Broth Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, wurde mit plasmidhaltigen Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler gezüchtet. 1.5 ml Aliquots der Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet (Eppendorf-Zentrifuge, 5 Minuten). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen, der Bakterienniederschlag in 100 µl eiskalter Lysozymlösung (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 4 mg/ml Lysozym) suspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl eiskalte, frisch bereitete 0.2 M NaOH, 1% SDS-Lösung zugesetzt, gemischt und 5 Minuten im Eiswasser belassen. Die Neutralisierung der Suspension erfolgte durch Zugabe von 150 µl eiskalter 5 M Kaliumacetatlösung pH 4.8 (eingestellt mit Eisessig), wobei gründlich durchmischt und dann weitere 5 Minuten im Eiswasser inkubiert wurde. Das Lysat wurde 5 Minuten in

der Sigma-Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorfgesäß überführt und mit gleichem Volumen an Phenol/Chloroform extrahiert. Danach wurde die DNA durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol gefällt und diese abzentrifugiert (Eppendorfszentrifuge, 5 Minuten, Raumtemperatur). Der DNA-Niederschlag wurde in 50 µl TE-Puffer, der 20 µg/ml DNase-freie RNase enthielt, aufgenommen und 1/5 davon für die Spaltung mit Restriktionsenzymen eingesetzt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

3.5.2. Kolonie-Hybridisierung

Zur schnellen Überprüfung einer großen Anzahl an Klonen auf Insertion ihrer Plasmide wurde die Technik der Kolonie-Hybridisierung nach Grunstein und Hogness (1975) verwendet. Hierbei wurden die durch Transformation erhaltenen Klone in einem definierten, übersichtlichen Raster auf eine neue Agarplatte durch Überpicken angeordnet ("Master plate"). Auf die Agarplatte wurde ein Nitrozellulose-Filter von der Größe der Agarplatte gelegt und nach vollständiger Benetzung desselben wieder abgenommen. Danach wurde der Filter mit den Kolonien nach oben auf ein mit 0.5 M NaOH getränktes Whatman 3MM Papier übertragen, darauf 10 Minuten belassen und danach zur Neutralisierung 2 Minuten auf ein mit 1 M Tris-HCl pH 7.5 und anschließend zur Äquilibration für 5 Minuten auf ein mit 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl durchtränktes Papier gelegt. Der Filter wurde auf ein wie unter 3.5.3. beschriebene DNA-Transfer-Vorrichtung übertragen und etwa 200 ml 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl durchsaugen lassen. Der Filter wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und danach 2 Stunden bei 80°C gebacken. Nun konnte der Filter direkt zur Hybridisierung eingesetzt werden.

oder auch zunächst, lichtfrei in eine Plastikfolie gepackt, bei 4°C aufbewahrt werden.

Für die Hybridisierung wurden die Filter in einer Lösung aus 6x NET, 10x Denhardt's, 0.1% SDS befeuchtet und anschließend, zusammen mit 20 ml Hybridisierungslösung mehrere Stunden bei 42°C im Schüttelwasserbad bei 42°C inkubiert. Die Hybridisierungslösung bestand aus 6x NET, 10x Denhardt's, 0.1% SDS und einer [³²P] markierten DNA-Probe in Form einer nicktranslatierten DNA oder eines 5'-[³²P] markierten Oligonukleotids (etwa 10⁶ cpm/ml).

Die Filter wurden nach der Hybridisierung 3x 5 Minuten bei Raumtemperatur oder gegebenenfalls auch bei höheren Temperaturen in etwa 200 ml 6x SSC gewaschen, an der Luft getrocknet und danach autoradiographiert.

1x NET:	0.15 M	NaCl
	15 mM	Tris-HCl pH 8.3
	1 mM	EDTA

1x SSC:	0.15 M	NaCl
	15 mM	Natriumcitrat pH 7.2

1x Denhardts's:	0.02%	Rinderserumalbumin (BSA)
	0.02%	Polyvinylpyrrolidon (PVP-40)
	0.02%	Ficoll 400

3.5.3. Transfer von DNA auf Nitrozellulose-Filter (nach Southern, 1975)

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden für Hybridisierungsexperimente auf Nitrozellulose-Filter übertragen (Southern, 1975). Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel 1 Stunde im Denaturierungspuffer (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH), danach so lange in der Neutralisierungslösung (0.5 M Tris-HCl pH 5.5, 0.9 M NaCl) geschwenkt, bis diese einen pH-Wert von < 7.5 erreicht hatte.

Whatman 3MM Papierstreifen wurden so über einen Plastikrost gezogen, daß sie durch Eintauchen in ein Vorratsgefäß mit 20x SSC die Flüssigkeit hochsaugten. Auf den Rost wurde ein mit 2x SSC angefeuchtetes 3MM Papier in der Größe des Agarosegels gelegt und darauf das Gel selbst. Das Gel wurde mit einem in 6x SSC getauchten Nitrozellulose-Filter gleicher Größe abgedeckt und darüber wurden zwei gleichgroße Whatman 3MM Papierbögen gelegt, wobei vorhandene Luftblasen sorgfältig entfernt wurden. Obenauf wurde ein Stapel Papierhandtücher gelegt, so daß mittels Kapillareffekt der 20x SSC-Puffer durchgesaugt wurde. Zur Vermeidung eines Kurzschlusses zwischen Puffer und Papierhandtücher wurden die Ränder des Filters mit etwa 3 cm breiten Plastikstreifen abgedeckt. Nach 1 Stunde Diffusionszeit wurde der Aufbau mit einem Gewicht von etwa 1kg beschwert und der DNA-Transfer über Nacht fortgeführt. Vor dem Abnehmen des Filters wurden die Auftragsstellen des Gels mit einem Filzstift markiert und anschließend der Filter 5 Minuten in 100 ml 6x SSC geschwenkt. Nach dem Trocknen des Filters auf Whatman 3MM Papier bei Raumtemperatur wurde dieser 2 Stunden bei 80°C gebacken.

1x SSC-Puffer: 0.15 M NaCl, 15 mM Natriumacetat pH 7.0

3.5.4. Hybridisierung von DNA/DNA ("Southernblot"; Southern, 1975)

Als Probe für die Hybridisierung wurde *in vitro* [^{32}P]markierte DNA verwendet. Kurz vor Gebrauch wurde die Hybridisierungslösung (50% Formamid, 50 mM Pipes, 5x SSC, 0.05% BSA, 0.05% Ficoll 400, 0.05% PVP) mit Hefe-tRNA, welche zuvor durch 3minütiges Aufkochen und anschließendem Abkühlen im Eiswasser denaturiert wurde, bis zu einer Endkonzentration von 400 µg/ml versetzt. Der bei 80°C gebackene Nitrozellulose-Filter wurde mit 6X SSC befeuchtet und zusammen mit dieser Hybridisierungslösung I (0.2 ml pro cm² Filterflä-

che) luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt und 16 Stunden im Schüttelwasserbad bei 42°C inkubiert (Prähybridisierung). Anschließend wurde die gesamte Flüssigkeit entfernt und durch die vorher kurz aufgekochte und im Eiswasser abgeschreckte Hybridisierungslösung II (50% Formamid, 50 mM Pipes, 5x SSC, 0.05 BSA, 0.05 Ficoll 400, 0.05 PVP, 200 µg/ml Hefe-tRNA, 0.05 ml/cm² Filterfläche) + der radioaktiven Probe ersetzt. Der Filter wurde erneut wieder luftblasenfrei verschweißt und 16 Stunden im Schüttelwasserbad bei 42°C inkubiert. Danach wurde der Filter für 2x 10 Minuten in 100 ml 2x SSC/0.1% SDS-Lösung bei Raumtemperatur und für 2x 15 Minuten in 100 ml 0.1x SSC/0.1% SDS-Lösung bei 52°C geschwenkt. Nach Trocknung des Filters bei Raumtemperatur wurde eine Autoradiographie durchgeführt.

Die radioaktive Hybridisierungslösung kann bei 4°C aufbewahrt und mehrmals verwendet werden.

1x SSC-Puffer: 0.15 M NaCl, 15 mM Natriumacetat pH 7.0

PVP: Polyvinylpyrrolidon

Sollte ein bereits in der Hybridisierung verwendeter Nitrozellulose-Filter erneut für eine Hybridisierung mit einer anderen radioaktiven Probe verwendet werden, wurde dieser vorher 60 Minuten in 200 ml Waschpuffer bei 90°C inkubiert.

Waschpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA, 0.5% Natriumpyrophosphat, 0.02% BSA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll 400

Autoradiographie:

Die nach der Hybridisierung getrockneten Filter wurden auf Whatman 3MM Papier mit Klebestreifen fixiert und mit Haushaltsfolie abgedeckt. Auf diese wurde eine Röntgenfilm (Kodak XAR-5) gelegt und in einer Kassette mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

3.5.5. Komplementaritätstest einzelsträngiger Phagen-DNA ("C-Test") (nach Messing, 1983)

Da der (+) Strang immer der virale Strang ist, können rekombinante Phagen, in welche ein DNA-Fragment in beide möglichen Orientierungen in die replikative Form (RF-DNA) kloniert wurde, über ihre Insertionen hybridisieren. Um nun zu testen, ob zwei rekombinante Phagen zu einander komplementäre DNAs besitzen, wurden jeweils 2 µl (etwa 100 ng) der isolierten einzelsträngigen DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl und in Anwesenheit von 250 mM NaCl 1 Stunde bei 65°C inkubiert und anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Hybridisierten die beiden viralen DNAs über ihre Insertion, so bildeten sie eine 8-förmige Struktur und zeigten eine geringere Laufgeschwindigkeit im Gel als der virale Einzelstrang.

3.6. DNA-SEQUENZIERUNG AN EINZELSTRÄNGIGER M13-DNA NACH DEM DIDESOX-KETTENABBRUCHVERFAHREN (nach Messing, 1983)

Primer-Annealing:

Zu 5 µl (etwa 0.5 µg) einzelsträngiger M13 Phagen-DNA wurden 2 µl (1 pMol) eines 17mer Oligonukleotids (Primer), 1 µl 10x Polymerase-Reaktionspuffer gegeben und mit H₂O auf 12.5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 1 Stunde im 55°C-Wasserbad inkubiert und anschließend die Didesoxyreaktionen durchgeführt.

Didesoxyreaktionen:

Während der "Annealing-Reaktion" wurden in die mit A,C,G und T bezeichneten Reaktionsgefäße 2 µl des unten angegebenen Mischungs-

verhältnisses an dNTP/ddNTP pipettiert und bis zum Gebrauch auf Eis belassen.

Nach erfolgtem "Primer-Annealing" wurden 1 µl 0.1 M DTT-Lösung, 1 µl Klenow-Polymerase (2 Einheiten) und 2 µl (20 µCi) einer wässrigen Lösung an [α - 35 S]-dATP (650 Ci/mMol) zugegeben, gründlich, aber luftblasenfrei durchmischt, jeweils 3 µl dieses Ansatzes auf die vorbereiteten Reaktionsgefäße A, C, G und T verteilt und dann 20 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden zu jedem Ansatz 2 µl einer dNTP-"Chase"-Lösung (vgl. S. 58) pipettiert, durch Ein- und Auspipettieren gründlich gemischt und die Inkubation für weitere 15 Minuten fortgesetzt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 8 µl eines Formamid-Farbstoffgemisches gestoppt. Vor dem Auftragen auf ein Sequenzgel (vgl. dazu Kap. 3.7.3.) wurden die Proben zur Denaturierung 2 Minuten aufgekocht und anschließend in Eis abgeschreckt.

Gelelektrophorese:

Jeweils 1 µl der denaturierten Proben wurden auf ein Sequenzgel aufgetragen und der Rest bei -80°C aufbewahrt. Die Vorbereitung der Sequenzgele erfolgte gemäß der Beschreibung in Kap. 3.7.3.

Polymerase-Reaktionspuffer: 70 mM Tris-HCl, pH 7.5
70 mM MgCl₂
500 mM NaCl

Formamid-Farbstoffgemisch: 0.1% (w/v) Xylencyanol
0.1% (w/v) Bromphenolblau
10 mM EDTA
95% (v/v) deionisiertes Formamid

Universalprimer (17mer): 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

(Produkt der Firma BRL)

Zusammenstellung der Mixe:

Die Mixe wurden durch Pipettierung geeigneter Mengen aus 0.5 mM dNTP- und 2 mM ddNTP-Stammlösungen erstellt und hatten, gelöst in 1x Polymerasepuffer, folgende Zusammenstellung:

A-Mix:	100 μ M dGTP	C-Mix:	100 μ M dGTP
	100 μ M dCTP		10 μ M dCTP
	100 μ M dTTP		100 μ M dTTP
	250 μ M ddATP		250 μ M ddCTP
G-Mix:	5 μ M dGTP	T-Mix:	100 μ M dGTP
	100 μ M dCTP		100 μ M dCTP
	100 μ M dTTP		5 μ M dTTP
	250 μ M ddGTP		1 mM ddTTP

3.7. DNA-SEQUENZIERUNG AN DOPPELSTRÄNGIGER PLASMID-DNA NACH DEM DIDESOXY-KETTENABBRUCHVERFAHREN (nach Wallace *et al.* 1981, modifiziert)

Eine alternative Methode zu den herkömmlichen DNA-Sequenzierungsverfahren (Maxam and Gilbert, 1980; Sanger *et al.*, 1977) ist die enzymatische Sequenzierung doppelsträngiger DNA nach dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren (Smith *et al.* 1979; Wallace *et al.*, 1981). Während beim Sanger-Verfahren einzelsträngige DNA, z.B. in Form des einzelsträngigen Phagen M13 (Messing *et al.* 1981) als Matrize verwendet wird, konnten Smith *et al.* (1979) und Wallace *et al.* (1981) zeigen, daß mit synthetischen Oligonukleotiden als Primer auch lineare doppelsträngige DNA nach der Denaturierung sequenziert werden kann. Eine der Vorzüge dieser Methode besteht darin,

daß die Qualität der durch Schnellaufschlüsse kleiner Übernachtkulturen isolierten Plasmide für gute Sequenzierungsergebnisse ausreichend ist und somit ein erheblicher Zeitgewinn erreicht wird.

Das Verfahren der Plasmidsequenzierung findet immer mehr Verbreitung wegen:

- a) seiner schnellen Durchführbarkeit und der damit verbundenen zeitlichen Überlegenheit gegenüber dem zeitintensiven Maxam-Gilbert-Verfahren (Maxam and Gilbert, 1980),
- b) der nicht mehr vorher notwendigen physikalischen Kartierung der Ziel-DNA,
- c) Unwägbarkeiten im M13-System, die darin liegen, daß gewisse DNA-Sequenzen nicht stabil in den M13-Vektor klonierbar und somit auch nicht korrekt replizierbar sind (Michel und Ehrlich, 1986) und so zu fehlerhaften Sequenzdaten führen,
- d) der direkten Analysemöglichkeit von Konstrukten, die in Polylinker-haltige Plasmide (z.B. Transkriptions- oder Expressionsplasmide) getätigt wurden.

Um doppelsträngige Plasmid-DNA sequenzieren zu können, muß diese in eine einzelsträngige Form gebracht werden. Prinzipiell bestehen zur Denaturierung der Plasmid-DNA zwei Möglichkeiten:

- a) die Hitzedenaturierung der linearisierten Form (Smith *et al.* 1979, Wallace *et al.* 1981),
- b) die alkalische Denaturierung der superhelikalen Form (Chen and Seeburg, 1985).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde vorwiegend die Denaturierung mit Alkali durchgeführt.

3.7.1. Isolierung der Plasmid-DNA für die Sequenzreaktion (Birnboim and Doly, 1979, modifiziert)

Die Güte der Plasmidpräparation ist entscheidend für den Erfolg eines Sequenzierungsexperiments. Sie sollte möglichst schonend durchgeführt werden, um vorwiegend intakte superhelikale Plasmid-DNA zu erhalten.

5 ml Übernachtskultur des entsprechenden Plasmidstammes wurden abzentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 7000 Upm, 4°C, 5 Minuten), der Niederschlag in 2.5 ml eiskaltem TNE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 100 µl Lysozymlösung (10 mg Lysozym/ml 10 mM Tris-HCl pH 8.0) und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 200 µl frisch bereitete SDS-Lösung (1% SDS in 0.2 M NaOH) zugegeben, leicht geschüttelt und gleich anschließend dazu 150 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4.8. Nach dem Schütteln und einer 15 Minuten langen Inkubation auf Eis wurde der Inhalt in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt und in der Sigma-Tischzentrifuge (12000 Upm, 15 Minuten, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, anschließend mit 2 Volumina Ethanol versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach der Zentrifugation (Eppendorfszentrifuge, 15 Minuten, Raumtemperatur) wurde der Niederschlag getrocknet, in 100 µl RNase-Puffer (0.1 mg RNase A pro ml 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM NaCl) aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Volumen durch Zugabe von 40 µl 3 M Natriumacetat pH 4.8 und 260 µl TE-Puffer auf 400 µl erhöht und Extraktionen mit Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vorgenommen. Nach Zugabe von 2 Volumina eiskaltem 95% Ethanol wurde 5 Minuten bei -80°C inkubiert und danach zentrifugiert (Sigma-Zentri-

fuge, 12000 Upm, 4°C, 10 Minuten). Der Niederschlag wurde mit 1 ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

Die Ausbeute betrug bei der Verwendung von pUC-Plasmiden etwa 20 µg Plasmid-DNA, die direkt für die Sequenzierung verwendet wurde. Alle Sequenzierungen wurden mit dem weichen β -Strahler [α - ^{35}S]-dATP durchgeführt, da hierbei hinsichtlich der Bandenschärfe (Biggin *et al.*, 1983) wesentlich bessere Ergebnisse erzielt wurden als bei der Verwendung des harten β -Strahlers [α - ^{32}P]-dATP. Zudem konnten die mit [α - ^{35}S]-dATP markierten Proben bis zu 2 Wochen bei -80°C aufbewahrt werden, ohne daß größere Autoradiolyseartefakte entstanden.

Für die Auftrennung der sequenzierten Proben wurden keilförmige Sequenzgele verwendet. Hierunter versteht man Sequenzgele, deren Dicke von vom oberen Ende (0.1 mm) zum unteren Ende (0.4 mm) keilförmig zunimmt. Dadurch kommt es zu gleichmäßigen Abständen der einzelnen Banden. Das Gel löst im oberen Bereich wesentlich besser auf und die dadurch bedingten größeren Bandenabstände erlauben es, längere Sequenzen zu lesen, so daß man einen ähnlichen Effekt erzielt wie bei Verwendung von Puffergradientengelen (Biggin *et al.*, 1983).

3.7.2. Sequenzreaktion

Das Volumen von 2 µg Plasmid-DNA wurde im Exsikkator zur Trockne gebracht und zur Denaturierung in 40 µl Denaturierungspuffer (0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA) aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Durch Zugabe von 4 µl 2 M Ammoniumacetatlösung pH 4.5

wurde die Lösung neutralisiert. Anschließend wurden 2 Volumina - 20°C Ethanol dazupipettiert, die Lösung 5 Minuten bei -80°C belassen und diese danach abzentrifugiert (Sigma-Zentrifuge, 10000 Upm, 4°C, 10 Minuten). Der DNA-Niederschlag wurde in 1 ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen für das "Primer-Annealing" verwendet.

Um den Primer an die DNA zu hybridisieren wurden in der "Primer-Annealing"-Reaktion zur denaturierten Plasmid-DNA 1 µl Oligonukleotid-Primer (2.5 pMol), 1.5 µl "Annealing"-Puffer, 2 µl [α -³⁵S]-dATP (650 Ci/mMol) und 9.5 µl Wasser pipettiert und das Gemisch 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Während des "Primer-Annealing" wurden in die mit A, C, G und T beschrifteten Eppendorfgefäße jeweils 2 µl der entsprechenden dNTP/ddNTP-Mischung (vgl. Schema unten) pipettiert und auf Eis gestellt. Nach Beendigung des "Primer-Annealing" wurde in diesen Ansatz 1 µl Klenow-Polymerase (2 Einheiten) pipettiert und der ganze Inhalt luftblasenfrei durchmischt. Danach wurden jeweils 3 µl in jedes Reaktionsgefäß pipettiert, wiederum gründlich durchmischt und dann für 20 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach dieser ersten Inkubation wurden jeweils 1.5 µl "Chase-Lösung" in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und die Inkubation für weitere 15 Minuten bei 30°C fortgesetzt. Danach wurden die Proben unter Vakuum getrocknet und in 4 µl Formamid-Farbstoff-Mix aufgenommen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben 2 Minuten lang gekocht und dann im Eiswasser abgeschreckt. Etwa 1 µl wurde auf das Sequenzgel aufgetragen.

"Annealing"-Puffer (10x): 70 mM Tris-HCl pH 7.5
 70 mM MgCl₂
 0.3 M NaCl
 0.1 M DTT
 1 mM EDTA

Formamid-Farbstoff-Mix: 98% entionisiertes Formamid
 10 mM EDTA
 0.2% Bromphenolblau
 0.2% Xylencyanol

Zusammenstellung der dNTP/ddNTP-Mixe:

Für die Herstellung der dNTP/ddNTP-Mixe wurden geeignete Aliquots aus 0.5 mM dNTP- bzw 2 mM ddNTP-Stammlösungen pipettiert und hatten, gelöst in 1x "Annealing"-Puffer, folgende Zusammensetzung:

"A-Mix"	100 µM dTTP	"G-Mix"	100 µM dTTP
	100 µM dCTP		100 µM dCTP
	100 µM dGTP		5 µM dGTP
	100 µM ddATP		120 µM ddGTP
 "C-Mix"	 100 µM dTTP	 "T-Mix"	 5 µM dTTP
	10 µM dCTP		100 µM dCTP
	100 µM dGTP		100 µM dGTP
	100 µM dCTP		500 µM ddTTP

"Chase"-Lösung: 0.125 M dNTP

Primer:

Universalprimer für pUC-Plasmide: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

Reverser Primer für pUC-Plasmide: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

3.7.3. Auftrennung der Proben über "keilförmige" Sequenzgele

Zur Auftrennung der sequenzierten Proben wurden überwiegend 5%ige, keilförmige Sequenzgele eingesetzt. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Apparatur (Macrophor™) der Firma LKB verwendet. Vor dem Gießen des Sequenzgels wurden die Platten vorbehandelt:

Obere Glasplatte:

5 ml Bindsilanlösung (18.75 μ l gamma-methacryloxypropyl-trimethoxysilane in 5 ml Ethanol) wurden auf der Glasplatte verteilt, 5 Minuten trocknen gelassen und diese dann mit Zellstoffpapier poliert. Anschließend wurde mit 5 ml Ethanol nachgewaschen und erneut poliert.

Thermostatisierplatte:

5 ml Silikonlösung wurden auf der Platte verteilt und nach 5minütigem Trocknen poliert. Der Vorgang wurde wiederholt, die Platte dann mit 5 ml Ethanol nachgewaschen und erneut poliert.

Die unterschiedliche Vorbehandlung der beiden Glasplatten gewährleistete, daß nach beendeter Elektrophorese das Gel beim Trennen der Platten an der oberen Platte haften blieb.

Nach der Vorbehandlung der Glasplatten wurden 60, 30, 20 und 10 cm lange und 0.1 mm dicke "Spacer" in der Weise angelegt, daß ein von oben (der Auftragsstelle) nach unten zunehmender Keil entstand. Das Gel wurde dann in horizontaler Lage gegossen und nach 2 Stunden Polymerisationszeit verwendet. Danach wurden die Taschen gründlich gespült und eine Vorelektrophorese durchgeführt (2000 V, etwa 25 mA, 45 min). Anschließend wurde je 1 μ l der vorher auf

100°C erhitzten und in Eiswasser abgeschreckten Proben mit einer Mikrokanüle (Markröhrchen) aufgetragen und die Elektrophorese bei 2500 V, 30 mA und einer konstanten Temperatur von 65°C durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese (nach etwa 1.5 - 2 Stunden) wurden die beiden Platten getrennt und das an der oberen Platte haftende Gel zur Harnstoffentfernung und Fixierung 15 Minuten lang in 10%iger Essigsäure gebadet, mit destilliertem Wasser gespült und dann 1 - 2 Stunden im 80°C-Schrank getrocknet. Danach wurde ein Röntgenfilm direkt auf das Gel gelegt, mit Klebestreifen fixiert und mit einer weiteren Glasplatte beschwert. Anschließend wurden die Platten lichtdicht verpackt und der Film 1 - 2 Tage bei Raumtemperatur exponiert.

Verwendete Gellösung:

21 g Harnstoff
6 ml einer 40% Acrylamid-Stammlösung
5 ml 10x TBE-Puffer
0.3 ml 10% Ammoniumperoxodisulfat
20 µl TEMED
x ml Wasser ad 50 ml Gesamtvolumen

Vor dem Gießen des Gels wurde die noch TEMED-freie Gellösung entgast und durch einen Millipore™-Filter (0.45 µm) filtriert.

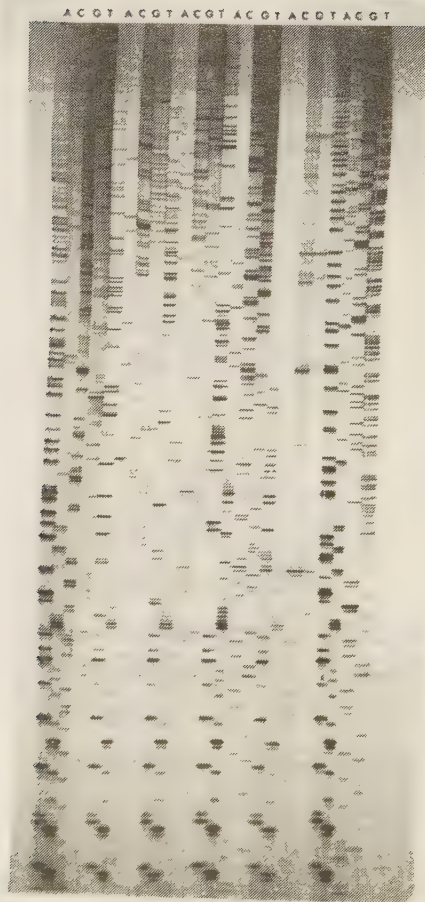


Fig. 2: Typisches Sequenzgel von Plasmidsequenzierungen

Dargestellt sind die durch Plasmidsequenzierung ermittelte Nukleotidsequenzen von insgesamt 6 pUC19-Klonen mit verschiedenen Insertionen. Die Markierung erfolgte mit $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{-dATP}$ und die Auftrennung der Proben über ein 5%iges, keilförmiges Sequenzgel.

3.8. GENOMISCHES SEQUENZIEREN NACH DEM DIDESOXY-KETTENABBRUCH- VERFAHREN

Genomische DNA läßt sich, sofern ein geeignetes Oligonukleotid als Primer zu Verfügung steht, nach dem Didesoxynukleosid-Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.* 1977) sequenzieren. Die hierbei eingesetzte Technik stellt ein modifiziertes Verfahren der Plasmidsequenzierung (Wallace *et al.* 1981; Chen and Seeburg, 1985) dar. Diese Technik erlaubt eine schnelle Identifizierung von Mutationen oder Deletionen innerhalb eines bekannten, auf dem Chromosom gelegenen DNA-Bereichs und ist wegen seiner einfachen Durchführung dem von Church und Gilbert (1984) beschriebenen Verfahren des genomischen Sequenzierens überlegen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Durchführbarkeit des enzymatischen, genomischen Sequenzierens mit prokaryontischer DNA als Matrize gezeigt werden. Die direkte Sequenzierung eukaryontischer DNA könnte wegen dessen Komplexität und der damit verbundenen eventuell großen Unspezifität der Primer-Hybridisierung schwieriger zu bewältigen sein.

10 µg chromosomale DNA wurden mit *Bam*HI vollständig gespalten, mit Phenol extrahiert und anschließend mit Ethanol präzipitiert. Der DNA-Niederschlag wurde in 10 µl H₂O aufgenommen, danach mit 1.5 µl 10x Polymerase-Puffer (70 mM Tris-HCl pH 7.5, 70 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA) und 2 µl (10 pMol) W1-Primer (vgl. S. 122) versetzt. Dieses Gemisch wurde in eine Glaskapillare (10 µl Mikropipette) eingeschmolzen, 5 Minuten bei 100°C gekocht und sofort im Eiswasser abgeschreckt. Der Inhalt der Kapillare wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, dazu 2 µl [α -³⁵S] dATP (650 Ci/mMol) und 1 µl Klenow Polymerase (2 Einheiten) pipettiert. Jeweils 3 µl der gründlich durchmischten Lösung wurden auf die A-, C-, G- und T-

Mixe verteilt und anschließend wie bei der oben beschriebenen Plasmidsequenzierung verfahren.

3.9. GELELEKTROPHORESEN ZUR AUFTRENNUNG VON DNA

3.9.1. Agarosegelelektrophorese (nach Maniatis *et al.*, 1982)

Zur Auftrennung von DNA-Molekülen für analytische und präparative Zwecke wurden horizontale Agarosegele verschiedener Konzentration (0.6 - 1.7%) und verschiedenen Ausmaßes (5x10, 13x16, 14x20 cm) eingesetzt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer (0.089 M Tris-Borat, 0.089 M Borsäure, 2 mM EDTA) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Anfärbung der DNA in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) geschwenkt und anschließend unter UV-Licht mit einer Polaroidkamera photographiert.

3.9.2. Polyacrylamidgelelektrophorese (nach Maniatis *et al.*, 1982)

Für die Auftrennung kleinerer Fragmente (100 - 600 bp) wurden 4 - 6%ige Polyacrylamidgele eingesetzt. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Die Größe der verwendeten Gele betrug 13x16 bzw. 12x24 cm.

3.9.3. Denaturierendes Polyacrylamidgel zur Auftrennung von Oligonukleotiden

Die Auftrennung von Oligonukleotiden erfolgte in einem 16%igen denaturierenden Polyacrylamidgel (Sequenzgel) (Maxam and Gilbert, 1980).

100 ml Gellösung enthielten:

15.2 g Acrylamid

0.8 g N,N'-Methylenbisacrylamid

48.0 g Harnstoff

10.0 ml 10x TBE-Puffer

0.06 µl N,N,N',N'-Tetramethylmethyldiamin (TEMED)

0.6 ml Ammoniumperoxodisulfat (10% in Wasser)

Vor dem Gießen des Gels wurde die Lösung (noch ohne TEMED) entgast. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer (0.089 M Tris-Borat, 0.089 M Borsäure, 2 mM EDTA) verwendet. Vor der Elektrophorese wurden die Taschen gründlich mit Wasser ausgespült. Vor dem Auftragen der Proben wurde zur Entfernung des Ammoniumperoxodisulfats eine 45 Minuten lange Vorelektrophorese bei 5 V/cm durchgeführt. Die Hauptelektrophorese erfolgte bei 8 V/cm und war nach etwa 4 Stunden beendet. Die Größe des verwendeten Gels betrug 12x24 cm.

3.10. COMPUTERANALYSEN

3.10.1. Analyse von DNA-Sequenzen

Die Analyse von Nukleotidsequenzen wurde mit dem Computerprogramm Microgenie der Firma Beckman durchgeführt.

3.10.2. Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen

Hierfür wurde ein Computerprogramm verwendet, das Proteinstrukturen gemäß den Regeln von Chou und Fasman (1974) voraussagt und auch die Werte der Hydrophobizität nach Hopp und Woods (1981) berechnet. Dieses Programm, ursprünglich von E. Golub (Cohen *et al.*, 1984) geschrieben, wurde leicht modifiziert und dem VAX 750 Computer angepaßt (S. Modrow, nicht publiziert). Die Analysen wurden von S. Modrow, Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1. CHARAKTERISIERUNG DER RIFAMPICINAUFNAHMEMUTANTEN

Tropschug (1980) konnte durch Nitrosoguanidin-Behandlung *Escherichia coli*-Mutanten gewinnen, deren RNA-Polymerase im *in vitro*-Aktivitätstest eine dem Wildtyp vergleichbare Sensitivität gegenüber Rifampicin aufwiesen, während diese *in vivo* auf Rifampicin-haltigem Medium zu wachsen vermochten. Kollenda (1981) konnte unter Verwendung des transduzierenden Phagen P1 die Transduzierbarkeit der Rifampicin-Resistenz der Nitrosoguanidin-Mutanten zeigen. Als Grundlage für meine Untersuchungen wurde die Nitrosoguanidin-Mutante 5/3 und die Transduktante 10/lt verwendet. Beide Mutanten wurden von mir noch einmal auf ihre Eigenschaften hin untersucht.

4.1.1. Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin

Die minimale Hemmkonzentration an Rifampicin wurde für die beiden Aufnahmemutanten 5/3 und 10/lt sowie deren Ausgangsstamm *E. coli* AB1157 bestimmt. Die Konzentration an Rifampicin, bei der nach 20 stündiger Bebrütung bei 37°C kein Wachstum mehr erfolgt, wird als minimale Hemmkonzentration bezeichnet und wurde für die Mutante 5/3 zu 50 µg/ml und für die Mutante 10/lt zu 120 µg/ml im Strichtest (vgl. Kap. 3.1.5.) bestimmt (vgl. Tab. 1). Die ermittelten Werte liegen niedriger als bei Tropschug (1980) und Kollenda (1985) angegeben.

Bakterien- stamm	Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin [$\mu\text{g/ml}$]	Resistenz- faktor
<i>E. coli</i> AB1157	10	1
<i>E. coli</i> 5/3	50	5
<i>E. coli</i> 10/1t	120	12

Tab.1 Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin in LB-Medium für die Mutanten 5/3, 10/1t und deren Ausgangsstamm *E. coli* AB1157

1 μl von Übernachtskulturen der im LB-Medium gewachsenen Stämme wurde auf LB-Agarplatten mit steigender Rifampicinkonzentration ausgestrichen und nach 20stündiger Bebrütung bei 37°C auf Wachstum kontrolliert.

4.1.2. Rifampicin-Empfindlichkeit der RNA-Polymerase

Als Aufnahmemutanten werden solche Stämme definiert, die auf höheren Rifampicinkonzentrationen als der Wildtyp zu wachsen vermögen, deren RNA-Polymeraseaktivität jedoch dieselbe Dosis-Wirkungskurve der Rifampicinhemmung zeigt wie die Enzymaktivität des Wildtyps (Tropschug, 1980). Die Messung der RNA-Polymeraseaktivität aus Rohextrakten in Abwesenheit und in Gegenwart unterschiedlicher Rifampicin-Konzentrationen von 0,08, 0,4 und 4 $\mu\text{g/ml}$ gibt Aufschluß über die Art der Mutation, die entweder in der RNA-Polymerase oder in anderen Zellkomponenten liegen kann.

Die Meßergebnisse (Tab. 2) lassen den Schluß zu, daß es sich bei den Stämmen 5/3 und 10/1t wirklich um Mutanten handelt, deren RNA-Polymerase nicht betroffen ist, da diese in Gegenwart von Rifampicin ein dem Wildtyp vergleichbares Hemmverhalten zeigen.

Bakterien- stamm	Einbau von [32 P]UMP in Gegenwart von Rifampicin [$\mu\text{g/ml}$]							
	0 [$\mu\text{g/ml}$]		0.08 [$\mu\text{g/ml}$]		0.4 [$\mu\text{g/ml}$]		4 [$\mu\text{g/ml}$]	
	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%	Ipm	%
AB 1157	7109	100	2300	32	1460	20	350	5
5/3	5780	100	1853	32	1350	23	280	5
10/1t	9740	100	3457	35	1840	19	470	5

Tab.2 Rifampicinhemmung der RNA-Polymeraseaktivität in Zellextrakten von *E.coli* AB1157 und davon abgeleiteten Rifampicin-resistenten Mutanten

Die Aktivität der RNA-Polymerase wurde gemessen wie in Kap. 3.2. beschrieben. 10 μl Rifampicinlösungen folgender Konzentration wurden anstelle von H_2O in den Inkubationsansatz pipettiert: 1 $\mu\text{g/ml}$ = 0.08, 5 $\mu\text{g/ml}$ = 0.4 und 50 $\mu\text{g/ml}$ = 4.0 $\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration an Rifampicin. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 μl Rohextrakt gestartet und nach 15min Inkubation bei 37°C die Restaktivität gemessen.

4.1.3. Wachstumsverhalten der Mutanten 10/1t und 5/3

- auf Rifampicinplatten

Die Beobachtung von Tropschug (1980), daß Rifampicinaufnahme-Mutanten auf Rifampicinplatten stets weniger Kolonien lieferten als auf Platten ohne zugesetztes Rifampicin, konnte bestätigt werden (Tab. 3). Auch bei anderen hemmstoffresistenten Mutanten wurde das Auftreten einer niedrigeren Anwachsrate ("efficiency of plating") von genetisch einheitlichen Kulturen beschrieben (Zähler und Maas, 1972; Koch und Gross, 1979).

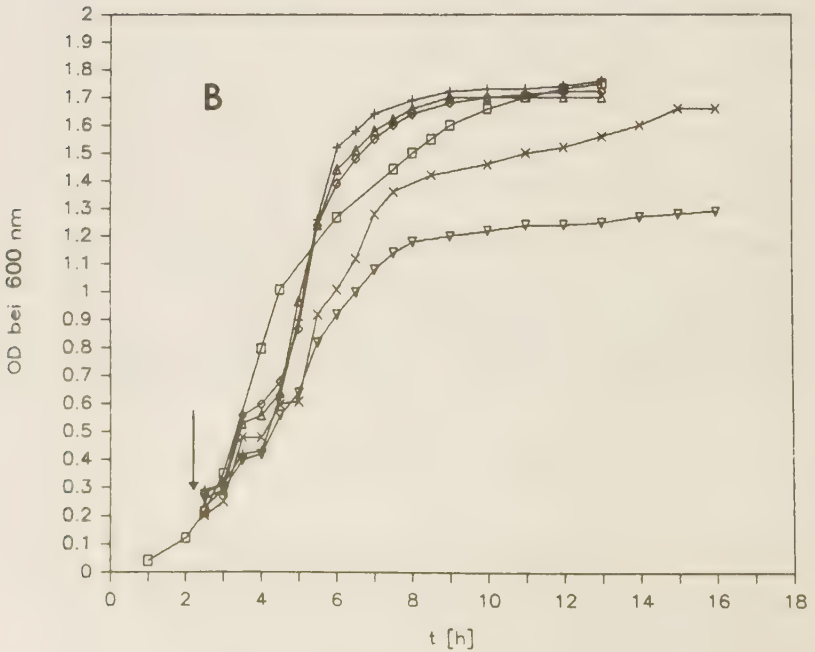
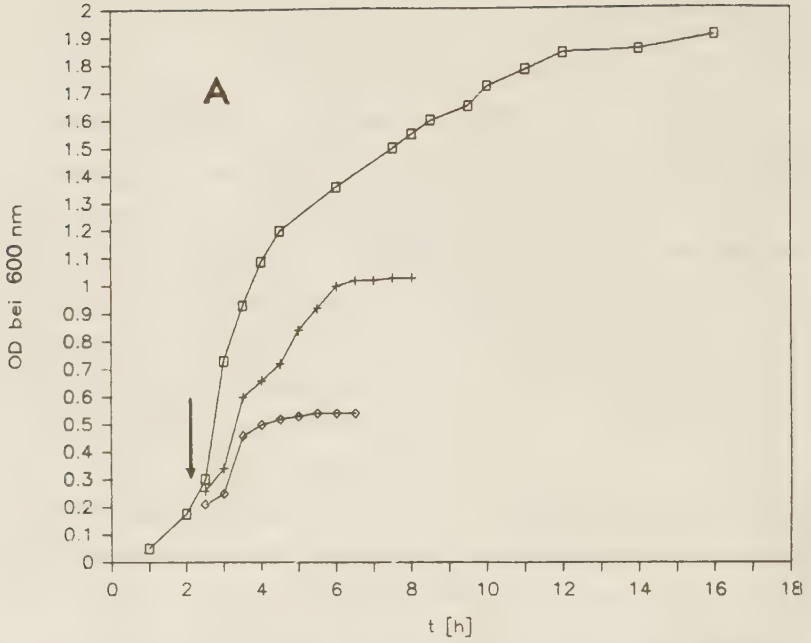
Bakterienstamm	Zellzahl auf Agarplatten mit Rifampicin [$\mu\text{g/ml}$]			
	0 [$\mu\text{g/ml}$]	20 [$\mu\text{g/ml}$]	50 [$\mu\text{g/ml}$]	100 [$\mu\text{g/ml}$]
AB 1157	320	0	0	0
5/3	370	220	35	0
10/1t	450	360	240	0

Tab.3 Wachstum der Stämme AB 1157, 10/1t und 5/3 auf LB-Platten mit und ohne Rifampicin

Übernachtskulturen dieser drei in LB-Medium gewachsenen Stämme wurden 10^{-7} verdünnt und jeweils 20 μl auf Agarplatten unterschiedlicher Rifampicinkonzentration ausgestrichen. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C wurde die Zellzahl auf den einzelnen Platten bestimmt.

- Wachstumskurven

Es wurden Wachstumskurven des Wildtypstammes *E.coli* AB1157 sowie der Mutanten 5/3 und 10/1t in Abwesenheit von Rifampicin bei 37°C gemessen (Fig. 3). Beim Wildtypstamm wurde nach 3 1/2 Stunden der 50%-Wert der endgültigen Zelldichte erreicht. Eine der beiden Mutantenstämme zeigte ein gegenüber dem Wildtypstamm deutlich unterschiedliches Wachstumsverhalten. Während die Mutante 10/1t sich in der Wachstumsgeschwindigkeit kaum vom Wildtyp unterscheidet (50%-Wert wurde nach 4 Stunden erreicht), wächst die Mutante 5/3 bedeutend langsamer (hier wurde der 50%-Wert erst nach 7 1/2 Stunden erreicht). Diese Beobachtung geht jedoch nicht konform mit den Ergebnissen von Tropschug (1977) und Kollenda (1981), die allen Rifampicinaufnahmemutanten als charakteristisches Merkmal ein verlangsamtes Wachstum zuschrieben. Als Ursache des verlangsamten Wachstums dieser Mutante kann aber nicht, wie von Tropschug (1981) diskutiert, ein erhöhter Salzbedarf geltend gemacht werden, da von allen drei Stämmen Wachstumskurven in zwei verschiedenen Vollmedien (einmal 50 mM NaCl, ein anderes Mal mit 25 mM MgCl₂ als Salzquelle) aufgenommen wurden, ohne daß signifikante Änderungen im Wachstumsverhalten feststellbar gewesen wären. Offenbar weist die Mutante 5/3 einen genetischen Defekt auf, der durch erhöhte Ionenstärke allein nicht behoben werden kann.



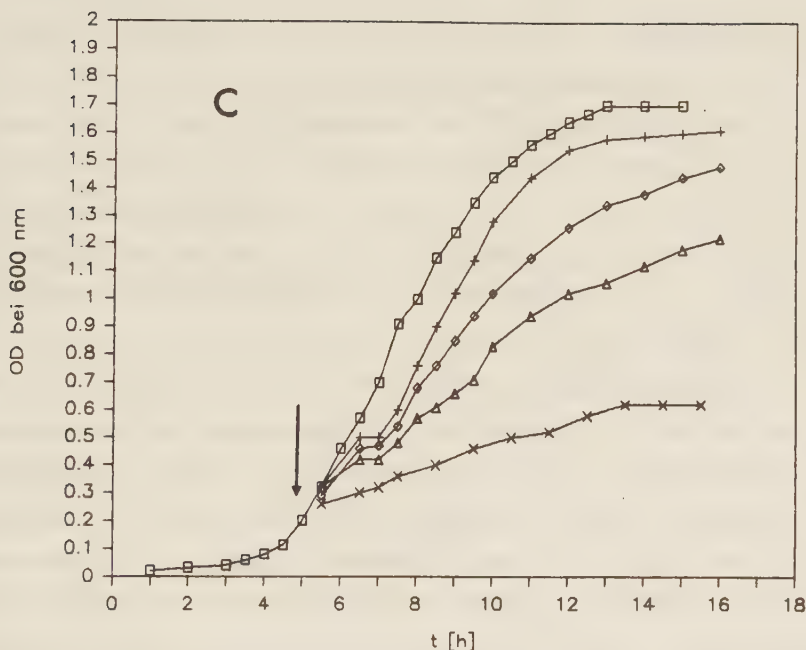


Fig. 3: Wachstumskurven des *E. coli* Wildtypstammes AB1157 und der Rifampicin-Aufnahmemutanten unter Rifampicineinfluss

- A) AB1157: □ 0 µg/ml + 10 µg/ml ◇ 20 µg/ml (Rifampicin)
- B) 10/1t □ 0 µg/ml + 10 µg/ml ◇ 30 µg/ml △ 50 µg/ml
 ×100 µg/ml ▽ 120 µg/ml
- C) 5/3: □ 0 µg/ml + 10 µg/ml ◇ 30 µg/ml △ 50 µg/ml
 ×60 µg/ml

Wachstumskurven des Wildtypstammes AB1157 und der Mutanten 5/3 bzw. 10/1t wurden in LB-Medium erstellt, gemäß der Beschreibung im Methodenteil (Kap. 3.1.). Bei einer $OD_{600} \approx 0.3$ (gekennzeichnet durch Pfeile) wurde aus einer Stammlösung von 10 mg/ml Rifampicin in unterschiedlichen Mengen zugesetzt.

- Wachstumskurven bei verschiedenen Rifampicinkonzentrationen

Durch die Zugabe von Rifampicin in verschiedenen Konzentrationen zu einer logarithmisch wachsenden Kultur sollte die Resistenzeigenschaft der Stämme AB 1157, 5/3 und 10/lt in Flüssigmedium ermittelt werden. Den wachsenden Kulturen wurde bei einer OD_{600nm} von ≈ 0.3 Rifampicin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (Fig. 3). Beim Wildtypstamm sind $10 \mu g/ml$ Rifampicin notwendig, um das Wachstum deutlich zu hemmen, $15 \mu g/ml$ bringen das Wachstum völlig zum Erliegen. Zwischen Zusatz des Antibiotikums und der einsetzenden Hemmwirkung liegen etwa 2 Stunden. Impft man ein bereits das Antibiotikum enthaltende Nährmedium mit einer Einzelkolonie an, genügen bereits $10 \mu g/ml$ Rifampicin, um ein Wachstum zu unterbinden. Bei den Stämmen 10/lt und 5/3 läßt sich die Resistenz voll bestätigen. 10/lt zeigt eine voll ausgeprägte Resistenz bis $100 \mu g/ml$ Rifampicin, erst bei $120 \mu g/ml$ ist eine Hemmwirkung feststellbar und bei $150 \mu g/ml$ kommt das Wachstum vollständig zum Erliegen. Bei diesen drei Stämmen bewirkt die Zugabe des Antibiotikums auch bei den höchsten verwendeten Konzentrationen die ersten 2 Stunden keine besondere Änderung im Wachstumsverhalten. Zeigt der Wildtypstamm nach dieser Verzögerungszeit ein deutliches Hemmverhalten, zeichnet sich die Mutante 10/lt 1 Stunde nach Zusatz des Antibiotikums in verschiedenen Konzentrationen ($10-70 \mu g/ml$) durch eine einstündige lag-Phase aus, um danach wieder in den gewohnten Wachstumsrhythmus zu verfallen (Fig. 3). Erst ab einer Rifampicinkonzentration von $80 \mu g/ml$ zeigt die Wachstumsgeschwindigkeit eine Abhängigkeit von der Antibiotikumkonzentration (Fig. 3B). Ein mit einer Einzelkolonie angeimpftes Medium erlaubt ein Anwachsen bis $100 \mu g/ml$ Rifampicin.

Die Mutante 5/3 zeigt neben dieser beschriebenen Verzögerungszeit der Hemmwirkung ein signifikant verzögertes Wachstum in Abhängigkeit von der Rifampicinkonzentration (10-50 µg/ml). Bei 60 µg/ml kommt es zum Wachstumsstillstand (Fig. 3C). Beim Animpfen des bereits Rifampicin-haltigen Mediums mit einer Einzelkolonie und sofortiger Anwesenheit des Antibiotikums, beobachtet man ein Anwachsen bis 50 µg/ml Rifampicin.

4.2. KLONIERUNG EINES RIFAMPICINRESISTENZ-GENS

Aus der genomischen DNA der oben charakterisierten Rifampicin-resistenten Stämme sollte der DNA-Abschnitt kloniert werden, welcher Resistenz gegenüber Rifampicin verleiht. Eine Transformation in verschiedene Bakterienstämme könnte eine eindeutige Abgrenzung von RNA-Polymerase-Mutanten erlauben und zudem ein in beliebiger Menge verfügbares Material für weitere molekularbiologische Untersuchungen liefern.

4.2.1. Erstellung einer Genbank der Rifampicinaufnahmemutanten 10/1t und 5/3 in den Vektor pBR322

Unter einer Genbank versteht man die Repräsentation der gesamten genetischen Information eines Organismus in Form rekombinierter Plasmide oder Phagen. Aus einer intakten Genbank läßt sich bei Verfügbarkeit entsprechender Detektionsverfahren nahezu jedes beliebige Gen aus einem Organismus isolieren. Dazu müssen jedoch einige Voraussetzungen erfüllt sein: die Wahrscheinlichkeit, daß sich ein bestimmtes Gen in der Ansammlung der rekombinierten Klone findet, hängt zum einen von der Größe des Genoms, zum anderen von

der gewählten Insertgröße ab. Die Wahrscheinlichkeit, daß irgendeine DNA-Sequenz in der Genbank repräsentiert ist, läßt sich nach der Formel von Clarke und Carbon (1976) ermitteln:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

N = Anzahl der erforderlichen Klone

P = gewünschte Wahrscheinlichkeit

f = Größe der Insertion im Verhältnis zur Gesamtgröße des verwendeten Genoms

Mit Hilfe dieser Formel errechneten Werte N stellen immer Minimalwerte dar und haben nur dann Gültigkeit, wenn alle rekombinierten Moleküle mit der gleichen Häufigkeit transformieren und jeder Klon das Ergebnis eines selbständigen Transformationsereignisses ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte aus den Rifampicin-resistenten Stämmen 5/3 und 10/1t eine Genbank erstellt werden. Da keinerlei biochemische Daten weder auf Protein- noch auf DNA-Ebene vorhanden waren, die einen Schluß auf die Größe des die Rifampicin-Resistenz verleihenden DNA-Bereiches zuließen, war es erforderlich, für die Insertion einen Größenbereich zu wählen, der sowohl ein typisches *E. coli*-Gen als auch eine Operonstruktur abdeckt. Als Größe wurde der Bereich zwischen 4 und 5 kb gewählt.

Um nun mit einer 90%igen Wahrscheinlichkeit eine bestimmte DNA-Sequenz in einer Genbank von 4 kbp-Fragmenten des *E. coli*-Genoms (3750 kb; Winnacker, 1984) vorzufinden, benötigt man :

$$N = \frac{\ln(1-0.90)}{\ln[1-(4000:3.75 \times 10^6)]} = 2172 \text{ Klone}$$

Bei einer gewünschten Wahrscheinlichkeit von 99% erhöht sich diese Zahl auf:

$$N = \frac{\ln(1-0.99)}{\ln[1-(4000:3.75 \times 10^6)]} = 4310 \text{ Klone}$$

Im Prinzip lassen sich für das Anlegen von Genbanken alle Vektoren (Plasmide, Lambda-Vektoren, Cosmide) verwenden. Die Wahl des Vektors muß jedoch den jeweiligen Bedürfnissen angepaßt werden. Als Klonierungsvehikel für die Gewinnung der Genbanken wurde das Plasmid pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) gewählt, ein 4363 bp langes Molekül (Sutcliffe, 1979; Peden, 1983), das aus drei Bereichen zusammengesetzt ist: dem Ampicillinresistenz-Bereich, dem Tetracyclinresistenz-Gen und der Region des Ursprungspunkt der Replikation. Durch Insertion einer fremden DNA in eines der Marker-Gene wird dieses inaktiviert und durch Plattierung auf zwei verschiedene Platten mit entweder Ampicillin oder Tetracyclin lassen sich das Wildtypplasmid und die rekombinanten Plasmide unterscheiden. Alle bisherigen Daten zur Aufklärung des Mechanismus der Rifampicin-Resistenz der Aufnahmemutanten deuten auf eine wesentliche Rolle der Membran hin. Liegt die Resistenzursache in einem Membranprotein, so ist zu bedenken, daß manche Membranproteine von der Zelle nur in geringer Kopienzahl synthetisiert werden. Bei der Verwendung von Vektoren mit sehr hohen Kopienzahlen, wie sie zum Beispiel die pUC-Plasmide darstellen, könnte die Gefahr bestehen, daß durch die Amplifizierung der klonierten Membranproteingene die Membran mit einer unphysiologisch großer Menge an Protein vollgepumpt wird und als Folge davon die Zellen absterben. Die gängige Methode der Wahl

für die Konstruktion einer bakteriellen Genbank ist wegen seiner leichten Durchführbarkeit die Klonierung von DNA-Fragmenten, die durch partielle Verdauung der hochmolekularen DNA mit Restriktionsenzymen, welche eine 4 bp-Sequenz erkennen und überhängende Enden erzeugen (Maniatis, 1978). Eine vollständige Verdauung mit Restriktionsenzymen würde ein sehr heterogenes Spektrum der Größenverteilung erzeugen und gerade wegen dieser Heterogenität des Fragmentgemisches keinen statistisch befriedigenden Einbau gewährleisten.

Für die Konstruktion der Genbank aus den Stämmen 10/1t und 5/3 wurde der Vektor mit *Bam*HI geöffnet und das durch *Sau*3AI-Hydrolyse erzeugte DNA-Gemisch, wie im folgenden beschrieben, einligiert. Eine Skizzierung der verwendeten Klonierungsstrategie findet sich in Fig. 4.

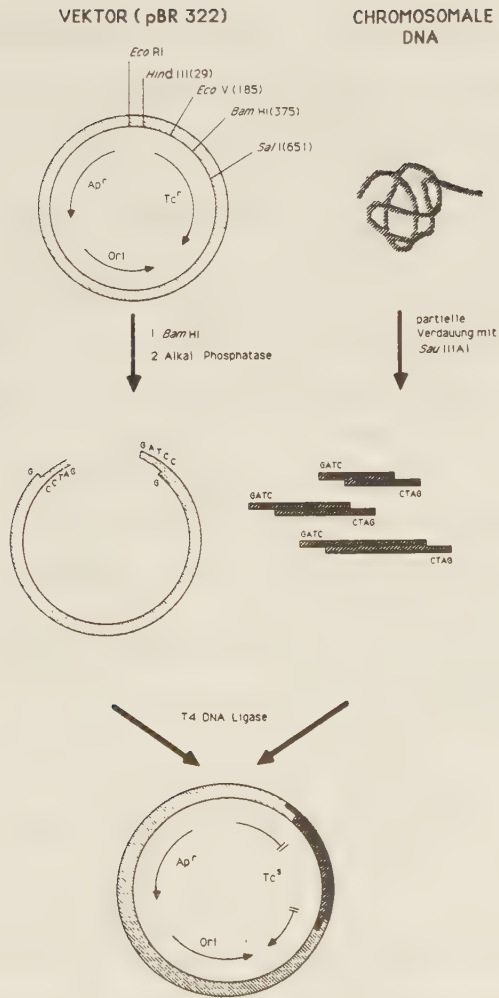


Fig. 4: Klonierungsstrategie zur Erstellung einer Genbank in den Vektor pBR322

Detaillierte Angaben zur Konstruktion der Genbanken aus den Rifampicin-Aufnahmemutanten 10/1t und 5/3 sind dem Kap. 4.2. bzw. dem Methodenteil zu entnehmen.

- Präparation des Vektors

Die DNA des Plasmids pBR322 wurde über CsCl-Gleichgewichtszentrifugation gereinigt (siehe Kap. 3.3.2.). Die Vektor-DNA wurde nun mit *Bam*HI geöffnet, zur Kontrolle der vollständigen Linearisierung über ein Agarosegel aufgetrennt und zur Verhinderung einer Rezirkularisierung mit alkalischer Phosphatase (Chaconas and van den Sande, 1980) behandelt (vgl. 3.4.2.). Ein linearisiertes Vektormolekül würde durch DNA-Ligase rezirkularisiert werden, wodurch der Einbau exogener DNA-Fragmente stark beeinträchtigt wäre. Eine Religation des dephosphorylierten Vektors ist somit nur dann möglich, wenn ein DNA-Fragment mit intakten 5'-Phosphatenden eingebaut wurde. So kann es sich bei einer Bildung zirkulärer Moleküle nur um Rekombinanten handeln. Zur Überprüfung der Vektorpräparation wurden Kontrolltransformationen durchgeführt. Der dephosphorylierte Vektor ergab nach einer Religation und Transformation in kompetente DH1-Zellen nur 2% der Anzahl an Transformanden wie sie beim unbehandelten zirkulären Vektor erhalten wurde.

- Isolierung der DNA-Fragmente aus der genomischen DNA

Die chromosomale DNA der Stämme 5/3 und 10/1t wurde gemäß der Beschreibung in Kap. 3.3.1. isoliert und anschließend, um eine statistisch akzeptable Grössenverteilung zu erzielen, mit dem Restriktionsenzym *Sau*3AI partiell verdaut. Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die partielle Verdauung der genomischen DNA wurde jeweils 1 µg DNA mit verschiedenen Enzymkonzentrationen eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Jeder Ansatz wurde hinsichtlich des Fortgangs der Verdauung über eine Agarose-Gelelektrophorese

(0.7%) kontrolliert (Fig. 5a) und der Größenbereich der entstandenen DNA-Fragmente durch Vergleich mit einem Längenstandard analysiert. Die Verdauungsbedingungen, die den Hauptanteil an DNA-Fragmenten im 4- bis 5 kb-Bereich ergaben, wurden durch Vergleich der Fluoreszenzstärke bestimmt. Eine Enzymkonzentration von 0.25 U *Sau3AI* erzielte bei der Verdauung von 1 µg DNA in beiden Fällen den Hauptanteil im gewünschten Größenbereich (Fig. 5a). Die in diesem Vorversuch ermittelten Bedingungen wurden auf eine Verdauung der DNA im größeren Maßstab übertragen. Hierzu wurden 250 µg DNA unter exakter Einhaltung von Enzymkonzentration (0.25 U/µg DNA), Zeit (1 h) und Temperatur (37°C) verdaut und ein Aliquot davon (1 µg) mittels Agarose-Gelelektrophorese (0.7%) auf die gewünschte Größenverteilung der Spaltprodukte hin überprüft. Die DNA-haltige Lösung wurde danach zweimal mit Phenol extrahiert und nach einer Ethanol-fällung in 500 µl TE-Puffer aufgenommen.

Aus dem Gemisch lassen sich die DNA-Fragmente der gewünschten Größe sehr gut durch eine Rohrzuckergradientenzentrifugation abtrennen (Maniatis, 1982). Dieses Verfahren zeichnet sich aus durch eine hohe Effizienz der Ausbeute und durch eine Reinheit des so isolierten DNA-Gemisches aus, was sich für die empfindliche Ligation nur positiv auswirken kann. Ein 10-40%iger Rohrzuckergradient wurde mit dem DNA-Gemisch beladen und gemäß der Beschreibung in Kap. 3.3.3. zentrifugiert. Nach Beendigung des Laufes wurden 0.5 ml-Fractionen gesammelt und Aliquots aus jeder dritten Fraktion durch Elektrophorese über ein 0.8%iges Agarosegel unter Verwendung eines Längenstandards analysiert (Fig. 5b). Im Falle der Fraktionierung der 10/1t-DNA (Fig. 5b,A) enthielten die Fractionen 24-27, bei der Fraktionierung der 5/3-DNA (Fig. 5b,B) die

Fractionen 19-21 die Hauptmenge an gewünschten DNA-Fragmenten. Die entsprechenden Fractionen wurden vereinigt, gegen TE-Puffer dialysiert und nach der Ethanol-fällung im selben Puffer aufgenommen. Die DNA-Menge wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt und betrug in beiden Fällen etwa 40 µg.

zu Fig. 5a:

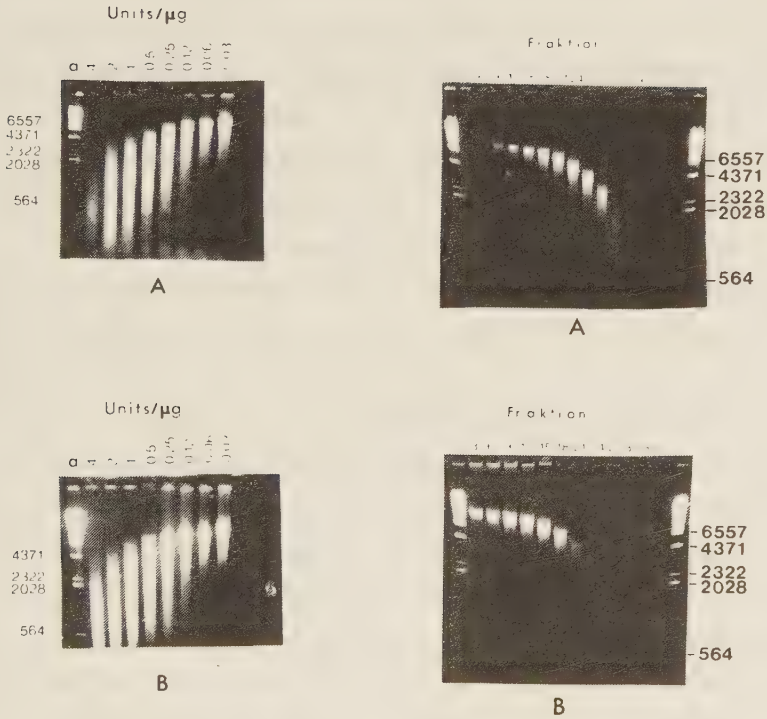
Zur Ermittlung der Bedingungen für die partielle Verdauung der genomischen DNA wurde jeweils 1 µg der DNA mit verschiedenen Mengen an *Sau3AI* 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden danach über ein 0.7%iges Agarosegel analysiert. Als Längenstandard diente die mit *HindIII* hydrolysierte Lambda-DNA. Die Versuchsbedingungen, unter denen die maximale Menge an DNA-Molekülen der gewünschten Größenordnung (4-5 kb) entsteht, wurde durch Abschätzung der Fluoreszenzintensität in den einzelnen Spuren bestimmt. 0.25 U des eingesetzten Enzyms (*Sau3AI*) erzeugte bei der Verdauung von 1 µg DNA ein Maximum im gewünschten Größenbereich.

A) 10/1t DNA B) 5/3 DNA Spur a: Lambda-DNA/*HindIII*

zu Fig. 5b:

Je 250 µg zelluläre DNA der Mutanten 10/1t und 5/3 wurden mit *Sau3AI* (0.25 U/µg) partiell verdaut und durch Zentrifugation über einen 10-40%igen Rohrzuckergradienten (siehe Kap. 3.3.3.) in 0.5 ml Portionen fraktioniert. Von jeder dritten Fraktion wurden 10 µl-Aliquots durch Agarosegelelektrophorese (0.8%) analysiert. Fractionen 24-27 von A (10/1t-DNA) und Fractionen 19-21 von B (5/3-DNA) wurden vereinigt und für die Konstruktion einer Genbank mit 4-5 kb-Fragmenten, kloniert in den Vektor pBR322, verwendet. Als DNA-Längenstandard diente die mit *HindIII* gesplante Lambda-DNA (erste und letzte Spur im Gel).

A) 10/1t DNA B) 5/3 DNA



linke Spalte:

Fig. 5a: Partielle Hydrolyse der zellulären DNA der Mutanten 10/1t (A) und 5/3 (B) mit *Sau3AI*

rechte Spalte:

Fig. 5b: Präparation von 4-5 kb-Fragmenten der zellulären DNA der Mutanten 10/1t (A) und 5/3 (B) im Großmaßstab

- Ligasereaktion: pBR322 mit fraktionierter DNA

Die Verknüpfung von linearisierter Vektor-DNA mit exogener DNA wird durch die T4 DNA-Ligase bewerkstelligt, ein Enzym, welches die kovalente Verknüpfung der DNA-Enden ermöglicht. Voraussetzung für eine optimale Enzymaktivität sind sauber präparierte DNA-Moleküle sowie sorgfältig ermittelte Inkubationsbedingungen. Zwei wichtige Parameter für eine intermolekulare Verknüpfung in der Ligasereaktion sind die Gesamtkonzentration der DNA und das molare Verhältnis von Vektor- und zu insertierender DNA. Die Einstellung dieser Parameter erfolgte über Berechnungen nach Dugaiczyk *et al.* (1975) und Williams und Blattner (1980). Der Fortgang der Ligasereaktion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese verfolgt und ist daran zu erkennen, daß monomere DNA-Formen verschwinden und dafür Spezies höheren Molekulargewichtes entstehen. Da zwischen der Effizienz der Ligasereaktion und der Ausbeute der sich anschließenden Transformation in kompetente bakteriellen Zellen nicht unbedingt eine Korrelation zu erwarten ist (Hanahan, 1983), wurde in den Ligasereaktionen das molare Verhältnis bezüglich der DNA variiert. Eingesetzt wurden molare Verhältnisse von 5:1, 3:1 und 1:1 (Vektor:Insert) und die Ligation entsprechend der Beschreibung in Kap. 3.4.6. durchgeführt. Das Verhältnis von 3:1 (Vektor:Insert) erwies sich in Hinblick auf die Transformationseffizienz als am besten.

- Transformation der rekombinierten DNA in kompetente DH1 Zellen

Die Transformationen wurden in Anlehnung an Hanahan (1983) unter Verwendung des Stammes DH1 durchgeführt (vgl. 3.1.4.). Insgesamt wurden 150 ng des Ligaseansatzes in 20 ng Aliquots transformiert und in geeigneten Portionen auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten (100 µg/ml) ausplattiert (Tab. 4). Zur Bestimmung der Transformationseffizienz der kompetenten Zellen wurde in einem Parallelansatz auch ungeschnittene Vektor-DNA transformiert.

Durch die Insertion in die *Bam*HI-Stelle von pBR322 sollte die Resistenz gegen Tetracyclin inaktiviert werden; bei Verwendung dieses Vektors besteht jedoch keine direkte Selektionsmöglichkeit der rekombinanten Klone, wie es z.B. bei den pUC-Plasmiden der Fall ist. Deswegen wurde zur Ermittlung des Verhältnisses zwischen Wildtyp- und rekombinierten Klonen jeweils ein definiertes Aliquot des Transformationsansatzes auf Tetracyclin und auf Ampicillin ausplattiert. Die erhaltene Anzahl an Transformanden mit einer Resistenz gegen Tetracyclin betrug $\approx 1-2\%$ im Vergleich zur erhaltenen Anzahl ampicillinresistenter Klone. Demzufolge waren 98% der nach der Transformation erhaltenen Klone rekombinanter Natur.

Bei Berücksichtigung aller, der in Tab. 4 zusammengefaßten Transformationszahlen ist festzustellen, daß die Anzahl der erhaltenen rekombinanten Transformanden bei weitem die theoretisch erforderliche Mindestzahl, die für eine 99%ige Repräsentierung der zu erstellenden *E.coli*-Genbank erforderlich ist (vgl. 4.2.1.), übertrifft.

Molares Ver- hältnis (Vektor:Insert)	Transformanden pro 10 ng Li- gaseansatz		Absolute Anzahl der Klone		Transfor- manden pro 1 µg DNA
	Ap ^r	Tc ^r	Ap ^r	Tc ^r	Ap ^r
10/t-Genbank					
5:1	1270	21	19000	320	1.3×10 ⁵
3:1	1560	24	23400	350	1.5×10 ⁵
1:1	1130	20	16800	290	1.1×10 ⁵
5/3-Genbank					
5:1	950	15	14250	230	9.5×10 ⁴
3:1	1180	18	17600	270	1.2×10 ⁵
1:1	820	14	12250	190	8.8×10 ⁴
Ungeschnittener Vektor (1 ng)	22500				2.25×10 ⁷

Tab. 4: Bestimmung der Transformationsfrequenzen der klonierten DNA aus den Aufnahmemutanten 10/1t und 5/3

Jeweils 10 ng rekombinierte DNA wurden im Standardansatz (vgl. 3.1.4.) transformiert und in 200 µl-Aliquots auf Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) und auf Platten mit Tetracyclin (15 µg/ml) ausgestrichen. Die Gesamtmenge der transformierten, auf Ampicillinplatten selektierten DNA betrug 150 ng.

- Überprüfung der Qualität der Genbanken

Die Qualität einer genomischen Genbank ist einer der wichtigsten Parameter für eine erfolgreiche Isolierung klonierter Gene. Bei einer Genomgröße der bakteriellen DNA von $3.75 \cdot 10^6$ bp und einer mittleren Insertionsgröße von 5 kb sollte jeder der 4500 Klone der Genbank eine ihm eigene Insertion tragen, welche wiederum nur einmal im bakteriellen Genom vorkommende Sequenzen enthalten soll. Sind diese Bedingungen erfüllt, dürfte jedwede nur interessierende Sequenz in der Genbank zu finden sein. Die Überprüfung der Komplexität der Genbank wurde dadurch angestellt, daß zunächst von beiden Genbanken 40 Klone willkürlich ausgewählt und von jedem Klon eine Plasmid-Minipräparation (vgl. 3.5.1.) durchgeführt wurde. Jeder Klon wurde sodann mit einem Restriktionsenzym mit einer 4bp-Erkennungssequenz (*Hae*III) geschnitten, wobei jeder Klon ein ihm eigenes Spaltmuster zeigte. Ein Teil der analysierten Klone ist in Fig. 6 dargestellt. Die Ergebnisse der Restriktionsanalysen lassen den Schluß zu, daß die Insertionen der untersuchten 2x40 Klone tatsächlich verschiedenen Ursprungs sind. Jeweils einer der aus beiden Genbanken ausgewählten Klone hatte keine Insertion und zeigte das gleiche Spaltmuster wie die als Längenstandard verwendete, *Hae*III-geschnittene pBR322-DNA.

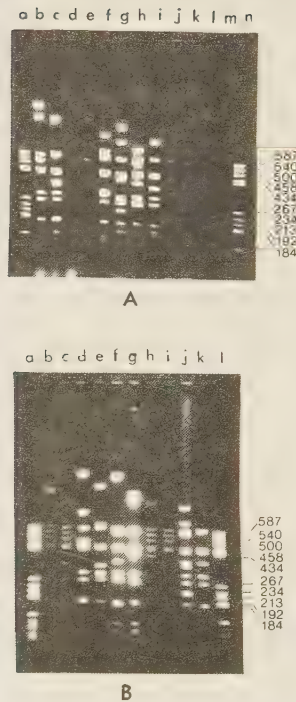


Fig. 6: Restriktionsverdauungen von Plasmid-Minipräparationen aus der 10/lt- (A) und 5/3-Genbank (B)

Je 2 µl der im Schnellaufschlußverfahren (siehe Kap. 3.5.1.) isolierten Plasmid-DNA wurden mit *Hae*III gespalten und auf einem 1.6%-Agarosegel analysiert. In den beiden Außenspurten (bei A: a und n; bei B: a und l) wurde ein DNA-Längenstandard (pBR322, *Hae*III) aufgetragen.

A: Spuren b-m: 12 beliebig ausgewählte Klone der 10/lt-Genbank

B: Spuren b-k: 10 beliebig ausgewählte Klone aus der 5/3-Genbank

4.2.2. Selektion auf Klone mit Rifampicin-Resistenz

Die anfängliche Idee zur Selektionierung Rifampicin-resistenter Klone war die direkte Plattierung des Transformationsgemisches auf rifampicinhaltige LB-Agarplatten. Die unter solchen Bedingungen gewachsenen Kolonien sollten eine plasmidkodierte Rifampicin-Resistenz aufweisen, welche durch Transformation beliebig oft auf sensitive Stämme übertragbar sein müßte. Mit diesem Selektionsverfahren konnte zwar aus jeder Genbank rund ein Dutzend Rifampicin-resistente Klone isoliert werden, deren Resistenzursache war jedoch auf Spontanmutationen der β -Untereinheit der RNA Polymerase in der chromosomalen DNA zurückzuführen. Denn eine Retransformation dieser zunächst phänotypisch resistenten Klone führte zu keiner Rifampicin-Resistenz mehr, so daß in diesen Fällen eindeutig *rpoB*-Mutanten vorliegen mußten (vgl. Diskussion).

In Abänderung dieses Standard-Transformationsverfahrens wurden die Ligaseansätze in kompetente DHL-Zellen transformiert und zunächst Aliquots von geeignetem Volumen auf ampicillinhaltige (100 $\mu\text{g/ml}$), jedoch rifampicinfreie LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert, so daß sich eine genügend hohe Kopienzahl der Plasmide einstellen konnte. Anschließend wurden die Transformanden zur Selektion in einem definierten Raster auf LB-Agarplatten, die verschiedene Antibiotika enthielten, überimpft:

- a) Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$)
- b) Tetracyclin (15 $\mu\text{g/ml}$)
- c) Rifampicin (50 $\mu\text{g/ml}$) + Ampicillin (50 $\mu\text{g/ml}$)

Im Falle der 10/1t Genbank wurden 18580 Transformanden, das bedeutet einen 4.5 fachen Überschuß der zur Repräsentierung der Genbank

erforderlichen Transformandenzahl (vgl. 4.2.1.), auf die 3 Agarplatten überimpft.

Zur Selektion der 5/3 Genbank wurden 16000 Transformanden (entspricht einem 4 fachen Überschuß) in gleicher Weise übertragen. Die Agarplatten mit den gepickten Kolonien wurden verschieden lange Zeiten bei 37°C bebrütet: Die lediglich auf Ampicillin- bzw. Tetracyclinplatten überimpften Kolonien wurden über Nacht inkubiert. Die jedoch auf rifampicin- + ampicillinhaltige Platten überimpften Klone wurden bis zu 72 Stunden bebrütet. Das Ergebnis der Inkubation ist in Tab. 5 zusammengefaßt und sieht wie folgt aus: im Falle der 10/1t Genbank war erst nach 24 Stunden Inkubation die erste Rifampicin-resistente Kolonie zu sehen, deren Zahl sich nach einer Inkubationsdauer von insgesamt 72 Stunden auf 17 erhöhte. Im Parallelansatz der 5/3 Genbank konnte man nach 24 Stunden Inkubation 2 und nach 72 Stunden 14 resistente Klone zählen.

Diese relativ große Zahl von Klonen mit phänotypischer Rifampicin-Resistenz wurde anschließend auf ihre plasmidkodierte Resistenz untersucht, um eventuell durch Spontanmutationen entstandene *rpoB*-Mutanten auszuschließen. In einer ersten Analyse wurde von jedem resistenten Klon eine Minipräparation der Plasmid-DNA durchgeführt und diese mit Restriktionsenzymen in der Weise gespalten, daß die insertierte DNA herausgeschnitten wurde. Nachdem die Klonierung durch Ligation von Fragmenten mit *Sau3AI*-Enden in die kompatible *BamHI*-Stelle des Vektors pBR322 erfolgte, bestand nur noch die Wahrscheinlichkeit von 1/16, daß durch Spaltung mit *BamHI* die Insertionen wieder herausgeschnitten werden konnten. Deswegen wurde

die Plasmid-DNA der Klone mit den beiden Enzymen gespalten, die "clockwise" (*SphI*) bzw. "anti-clockwise" (*ClaI*) der Klonierungsstelle (*BamHI*) benachbart sind. Die Restriktionsanalyse ergab in allen Fällen Insertionen im Größenbereich zwischen 2.35 und 9 kb (nicht gezeigt). Die über eine 5 kb-Größe hinausgehenden Insertionen gehen wohl auf "tandem"-Insertionen zurück.

Anzahl an Klonen	Inkubationsdauer [h]					
	12	24	36	48	60	72
10/lt						
Ampicillin	18500	-	-	-	-	-
Tetracyclin	340	-	-	-	-	-
Ampicillin+ Rifampicin	0	1	3	7	12	17
5/3						
Ampicillin	16000	-	-	-	-	-
Tetracyclin	315	-	-	-	-	-
Ampicillin+ Rifampicin	0	2	2	5	8	14

Tab. 5: Selektion Rifampicin-resistenter Klone

Die Transformanten aus der 10/lt- und 5/3-Genbank wurden auf LB-Agarplatten, die unterschiedliche Antibiotika enthielten, überimpft:

- a) auf Ampicillin (100 µg/ml)
- b) auf Tetracyclin (15 µg/ml)
- c) auf Rifampicin (50 µg/ml) + Ampicillin (50 µg/ml)

Die auf Ampicillin- bzw. Tetracyclinplatten überimpften Kolonien wurden über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Inkubationszeit der auf rifampicin- + ampicillinhaltigen Agarplatten übertragenen Kolonien betrug 72 h, wobei das Wachstum alle 12 h überprüft wurde.

4.2.3. Charakterisierung der selektionierten Klone

Ein plasmidkodiertes Rifampicin-Resistenzgen sollte sich auch wiederholt in einen kompetenten, aber Rifampicin-sensitiven Wildtyp-Stamm transformieren lassen. Zur Prüfung wurden die Plasmide aller 31 Rifampicin-resistenten Klone isoliert und die Plasmid-DNA wieder in parallelen Ansätzen in die transformationskompetenten Stämme DH1 und HB101 transformiert. Die zunächst auf Ampicillin (100 µg/ml) selektionierten Klone wurden anschließend auf ihre Rifampicin-Resistenz überprüft. Hierfür wurden zum einen von jedem Transformationsansatz jeweils eine definierte Anzahl an Klonen auf LB-Agarplatten mit konstanter Ampicillin- (50 µg/ml), jedoch steigender Rifampicinkonzentration (5-50 µg/ml) überimpft und 15 Stunden bei 37°C bebrütet, zum anderen wurde jeweils eine Kolonie jedes neu transformierten Klons in ampicillinhaltiges Medium (100 µg/ml) überimpft und bei 37°C wachsen gelassen. 100 µl der 10⁻⁷ verdünnten, logarithmisch wachsenden Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit ebenfalls konstanter Ampicillin- (50 µg/ml), aber steigender Rifampicin-Konzentration (5-50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Klon	Rifampicin-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]						
	0	5	10	20	30	40	50
DH1/pBR322	+	-	-	-	-	-	-
1a	+	-	-	-	-	-	-
1b	+	+	+	+	+	+	+
1j	+	+	+	+	+	+	+
1l	+	+	-	-	-	-	-
1m	+	+	+	+	+	+	+
1u	+	+	+	+	+	+	+
2a	+	+	-	-	-	-	-
2e	+	-	-	-	-	-	-
2f	+	+	+	+	+	+	+
2g	+	-	-	-	-	-	-
3a	+	-	-	-	-	-	-
3b	+	+	+	+	+	+	+
3d-1	+	+	+	+	+	+	+
3t	+	+	+	+	+	+	+
3y	+	+	+	+	+	+	+
4a	+	-	-	-	-	-	-
4b	+	-	-	-	-	-	-
4c	+	-	-	-	-	-	-
4d	+	+	+	+	+	+	+
4f	+	-	-	-	-	-	-
4g	+	-	-	-	-	-	-
4j	+	+	+	+	+	+	+
5a	+	-	-	-	-	-	-
5b	+	-	-	-	-	-	-
5c	+	-	-	-	-	-	-
5d	+	-	-	-	-	-	-
6a	+	-	-	-	-	-	-
6b	+	-	-	-	-	-	-
6c	+	-	-	-	-	-	-
6d	+	-	-	-	-	-	-
6e	+	-	-	-	-	-	-

Tab. 6: Wachstumsverhalten der selektionierten Rifampicin-resistenten Klone gegenüber steigender Rifampicin-Konzentration nach wiederholter Transformation

Die Plasmide der 31 selektionierten, Rifampicin-resistenten Klone wurden in den *E.coli*-Stamm DHL transformiert und zunächst auf Ampicillin (100 µg/ml) selektioniert. Anschließend wurden von jedem Transformationsansatz jeweils 50 Kolonien auf LB-Agarplatten konstanter Ampicillin- (50 µg/ml), jedoch steigender Rifampicin-Konzentration (0-50 µg/ml) überimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. In Parallelansätzen wurde von je einem Klon jedes Transformationsansatzes eine Flüssigkultur (LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin) angelegt und bis zur logarithmischen Phase wachsen gelassen. Je 100 µl der 10⁻⁷ verdünnten Kultur wurden auf LB-Agarplatten mit konstanter Ampicillin- (50 µg/ml), jedoch steigender Rifampicin-Konzentration (0-50 µg/ml) ausplattiert und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert.

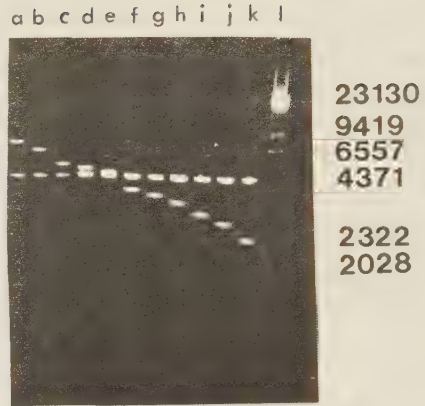
+ = Wachstum der überimpften Kolonien
 - = kein Wachstum der überimpften Kolonien

Klone 1b, 1j, 1m, 1u, 2f, 3b, 3d-1, 3t, 3y, 4d und 4j sind unter den beschriebenen Bedingungen angewachsen.

Die Auswertung dieser Experimente (Tab. 6) zeigt deutlich, daß die Resistenz eines Teiles der zunächst als Rifampicin-resistent selektionierten Klone auf Spontanmutationen in der β -Untereinheit der RNA Polymerase zurückzuführen war, denn die erneute Transformation dieser Klone führte nicht mehr in allen Fällen zu einer phänotypischen Ausprägung einer Rifampicin-Resistenz. Von den anfangs 31 Rifampicin-resistenten Klonen vermochten nach wiederholter Transformation nur noch 11 eine Resistenz gegenüber Rifampicin zu manifestieren. Von diesen 11 resistenten Klonen leiteten sich 5 von der 5/3 Genbank und 6 von der 10/1t Genbank ab. Diese 11 Klone werden im folgenden als 1b, 1j, 1m, 1u, 2f, 3b, 3d-1, 3t, 3y, 4d und 4j bezeichnet. Alle diese 11 resistenten Klone sind sowohl nach Einzelüberimpfung als auch nach Ausplattierung der logarithmisch wachsenden Kultur bis zu einer Rifampicinkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ angewachsen (Tab. 6).

Die Restriktionsanalyse dieser 11 selektionierten Klone mit *SphI*-*ClaI* ergab Insertionen zwischen 2.35 und 9 kb (Fig. 7 und Tab. 7). Um diese Klone letztendlich als *rpoB* unabhängige Mutanten klassifizieren zu können, wurde die Sensitivität ihrer RNA-Polymerase-Aktivität gegenüber Rifampicin bestimmt (Tab. 8). Die Daten dieses Experimentes zeigen deutlich, daß die RNA-Polymerasen aller getesteter Klone gegenüber Rifampicin sensitiv sind, wobei die Größenordnung der Hemmung in allen 11 Fällen in etwa dieselbe ist. Zur weiteren Charakterisierung wurde von allen Rifampicin-resistenten Klonen die minimale Hemmkonzentration an Rifampicin sowie die Anwachsrate "efficiency of plating" bestimmt.

Klon	Länge der <i>SphI/ClaI</i> - Insertion (bp)
lb	8500
lu	6600
3d-1	5300
lm	4500
lj	4400
2f	4050
3b	3900
3t	3700
3y	3300
4d	3000
4j	2350



links:

Tab. 7: Längenbestimmung der Insertionen von Plasmiden Rifampicin-resistenter Klone

rechts:

Fig. 7: Restriktionsanalyse der Rifampicin-resistenten Klone durch Hydrolyse mit *SphI-ClaI*

Die über CsCl-Gleichgewichtszentrifugation gereinigten Plasmid-DNAs wurden mit *ClaI+SphI* hydrolysiert und anschließend über ein 0.8%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größe der Insertionen wurde durch Vergleich mit dem verwendeten Längenstandard (Lambda DNA/*HindIII*) bestimmt.

Spur a: lb b: lu c: 3d-1 d: lm e: lj f: 2f

Spur g: 3b h: 3b i: 3t j: 3y k: 4d l: 4j

Spur l: Lambda-DNA/*HindIII*

Klon	Einbau von [32 P]UMP in Gegenwart von Rifampicin [μ g/ml]							
	0 [μ g/ml]		0.08 [μ g/ml]		0.4 [μ g/ml]		4 [μ g/ml]	
	IpM	%	IpM	%	IpM	%	IpM	%
DH1	7200	100	3168	44	1656	23	576	8
DH1/pBR322	5930	100	2431	41	1245	21	415	7
1b	5730	100	2578	45	1272	22	562	10
1m	4875	100	1852	38	926	19	438	9
1u	4976	100	2089	42	995	20	480	10
1j	6123	100	2265	37	1224	20	620	10
2f	5915	100	2898	49	1597	27	1064	18
3b	4617	100	2123	46	1154	25	715	15
3d-1	6215	100	2175	35	1056	17	346	5.6
3t	5315	100	2126	40	1116	21	544	10
3y	4920	100	1771	36	934	19	705	14
4d	5673	100	2325	41	1304	23	737	13
4g	6022	100	2408	40	1324	22	612	10
4j	5219	100	2035	39	1004	19	574	11

Tab. 8: Hemmung der RNA Polymerase-Aktivität in Zellextrakten von Rifampicin-resistenten Klonen

Die Aktivität der RNA Polymerase wurde, wie in Kap. 3.2. beschrieben, bestimmt. In allen getesteten Klonen ist die RNA-Polymerase sensitiv gegenüber Rifampicin. Eine 50%-Hemmung der RNA-Polymerase-Aktivität war in allen Fällen bei einer Rifampicin-Konzentration von $<0.08 \mu\text{g/ml}$ festzustellen. Die Restaktivität der RNA-Polymerase bewegt sich bei der eingesetzten Höchstkonzentration von $4 \mu\text{g/ml}$ in den getesteten Fällen zwischen 5 und 18%.

Klon	Minimale Hemmkonzentration [µg/ml] Rifampicin	Resistenz- faktor
DH1/pBR322	5	1
1b	40	8
1m	65	13
1u	55	11
1j	50	10
2f	45	9
3b	60	12
3d-1	100	20
3t	70	14
3y	55	11
4d	50	10
4j	60	12

Tab. 9: Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin in DH1-Medium aller Rifampicin-resistenten Klone und dem Ausgangs-stamm DH1/pBR322

1 µl von Übernachtskulturen der im ampicillinhaltigen (100 µg/ml) DH1-Medium gewachsenen Klone wurden auf DH1-Agarplatten mit konstanter Ampicillin- (50 µg/ml), jedoch steigender Rifampicinkonzentration ausgestrichen und nach 20stündiger Bebrütung bei 37°C auf Wachstum kontrolliert.

Klon	Zellzahl auf Agarplatten mit Rifampicin [$\mu\text{g/ml}$]									
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
DH1/pBR322	425	2								
1b	485	436	282	195	45					
1m	487	445	395	336	288	223	187			
1u	523	485	418	385	225					
1j	565	481	412	369	271	24				
2f	515	443	392	318	268	19				
3b	464	419	313	267	215	194	48			
3d-1	479	452	422	383	360	334	315	287	255	195
3t	495	444	402	369	337	292	212	36		
3y	548	488	432	307	223	65				
4d	570	513	460	334	263	79				
4j	519	468	421	379	317	202	64			

Tab. 10: Anwachsrate der Rifampicin-resistenten Klone auf DH1-Agarplatten mit und ohne Rifampicin

Übernachtskulturen der in ampicillinhaltigen Medien ($100 \mu\text{g/ml}$) gewachsenen Stämme wurden 10^{-7} verdünnt und jeweils $20 \mu\text{l}$ auf DH1-Agarplatten mit konstanter Ampicillin- ($50 \mu\text{g/ml}$), jedoch variierender Rifampicinkonzentration ausplattiert. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C wurde die Zellzahl der einzelnen Platten bestimmt.

Die minimale Hemmkonzentration aller getesteter Klone, mit Ausnahme des Klons 3d-1, bewegte sich zwischen 40 und 70 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin (Tab. 9). Der Klon 3d-1 zeichnete sich durch eine besonders hohe Resistenz gegenüber Rifampicin aus (minimale Hemmkonzentration: 100 $\mu\text{g/ml}$). Diese im Vergleich zu den anderen Klonen gesteigerte Resistenzeigenschaft des Klons 3d-1 bestätigte sich auch im Wachstumsverhalten auf Agarplatten mit steigender Rifampicinkonzentration ("efficiency of plating") (Tab. 10). Das bereits in Kap. 4.1.3. diskutierte Phänomen, daß Rifampicinaufnahmemutanten auf Rifampicinplatten stets weniger Kolonien lieferten als auf Platten ohne zugesetztes Rifampicin, fand auch im Falle der Rifampicin-resistenten Klone eine Bestätigung (Tab. 10).

Bei zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse aus der Charakterisierung der Rifampicin-resistenten Klone (vgl. Tab. 8, 9, 10), nimmt der Klon 3d-1 bezüglich der Resistenz eine Sonderstellung ein. Er zeichnet sich nicht nur durch die höchste minimale Hemmkonzentration an Rifampicin (100 $\mu\text{g/ml}$), sondern auch durch die geringste Restaktivität (6.5%) bei 4 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin im Aktivitätstest der RNA-Polymerase aus (Tab. 8). Diese im Vergleich zu den anderen resistenten Klonen herausragenden Eigenschaften von Klon 3d-1 hinsichtlich der Rifampicin-Resistenz waren ausschlaggebend dafür, diesen Klon für weitere Untersuchungen auszuwählen.

4.3. VERKÜRZUNG DES RIFAMPICIN-RESISTENTEN KLONS 3d-1

Die in 4.2.3. gewonnenen Erkenntnisse zeigen eindeutig, daß die Rifampicin-Resistenz von Klon 3d-1 plasmidkodiert und *rpoB*-unabhängig ist. Verantwortlich für die Resistenz zeichnet offenbar die ca. 5.3 kb große Insertion. Dieses DNA-Fragment sollte nun, unter Beibehaltung seiner biologischen Aktivität, auf ein Mindestmaß reduziert und anschließend auf molekularer Ebene näher analysiert werden.

4.3.1. Herstellung von Deletionsklonen durch ExonukleaseIII

ExonukleaseIII katalysiert die schrittweise Entfernung von 5'-Mononukleotiden vom 3'OH-Ende einer doppelsträngigen DNA, wobei jedoch 3'-überhängende Enden wesentlich schlechter abgebaut werden als 3'-rezessive Enden (Guo and Wu, 1982). Bei anschließender Verdauung mit S1-Nuklease, kann ExonukleaseIII zur Verkürzung von DNA-Fragmenten eingesetzt werden, um Deletionen zu konstruieren (Jasin *et al.*, 1983).

Das, die Rifampicin-Resistenz induzierende, 5.3 kb große DNA-Fragment kann durch Hydrolyse mit *SphI*+*ClaI* aus dem rekombinanten Plasmid 3d-1 herausgeschnitten werden. *SphI* erzeugt 3'-überhängende, *ClaI* jedoch 5'-überhängende Enden. Somit wäre nur das *ClaI*-Ende des Fragments einer ExonukleaseIII-Behandlung zugänglich. Um nun Deletionen von beiden Enden des DNA-Fragments einführen zu können, müssen diese zunächst mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase in glatte Enden überführt werden, welche dann im gleichen Maß von der ExonukleaseIII abgebaut werden können.

Das über CsCl-Gleichgewichtszentrifugation gereinigte Plasmid von Klon 3d-1 wurde mit *SphI*+*ClaI* hydrolysiert und anschließend über

ein 0.7% "low melting point"-Agarosegel aufgetrennt. Das 5.3 kb große *SphI/ClaI*-DNA-Fragment wurde nach Langridge *et al.* (1980) isoliert. Zur Erzeugung von glatten Enden wurde das DNA-Fragment in Gegenwart der vier Desoxyribonukleotide mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase inkubiert. Anschließend wurde das aufgefüllte DNA-Fragment mit ExonukleaseIII behandelt, in 10 gleichen Zeitabständen Aliquots entnommen und diese mit *S1*-Nuklease behandelt. Das so entstandene, bezüglich der Größenverteilung heterogene Gemisch glattendiger DNA-Fragmente wurde in Einzelansätzen in die kompatible *SmaI*-Stelle des Vektors pUC8 (Messing and Vieira, 1982) ligiert und anschließend in kompetente JM83 Zellen transformiert (siehe auch Fig. 8). Von jedem Transformationsansatz wurden 5 weiße (rekombinierte) Kolonien ausgewählt und deren Plasmide hinsichtlich der Größenverteilung der Insertionen untersucht. Die Restriktionsanalyse der ausgewählten, insgesamt 50 rekombinanten Plasmide ergab Insertionen, deren Größenbereich sich von 500-3500 bp erstreckte (nicht gezeigt).

In der Hoffnung, daß einer der Deletionsklone den für die Expression der Rifampicin-Resistenz essentiellen DNA-Bereich tragen würde, wurde die Plasmid-DNA jeder Deletionsmutante einzeln sowohl in kompetente JM83 als auch in HB101 Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte zunächst auf ampicillinhaltige (100 µg/ml) Agarplatten und anschließend auf Agarplatten steigender Rifampicinkonzentration (5-50 µg/ml).

Keiner dieser untersuchten Deletionsklone konnte jedoch eine biologische Aktivität in Form einer Rifampicin-Resistenz entfalten. Die minimale Hemmkonzentration betrug in allen Fällen 10 µg/ml. Dieser Wert entspricht auch dem des Wildtypplasmids pUC8. Der Grund für die fehlende Expression der Rifampicin-Resistenz liegt

wohl darin, daß durch die erzeugten Deletionen für die Expression der Resistenz notwendige DNA-Bereiche entfernt wurden.

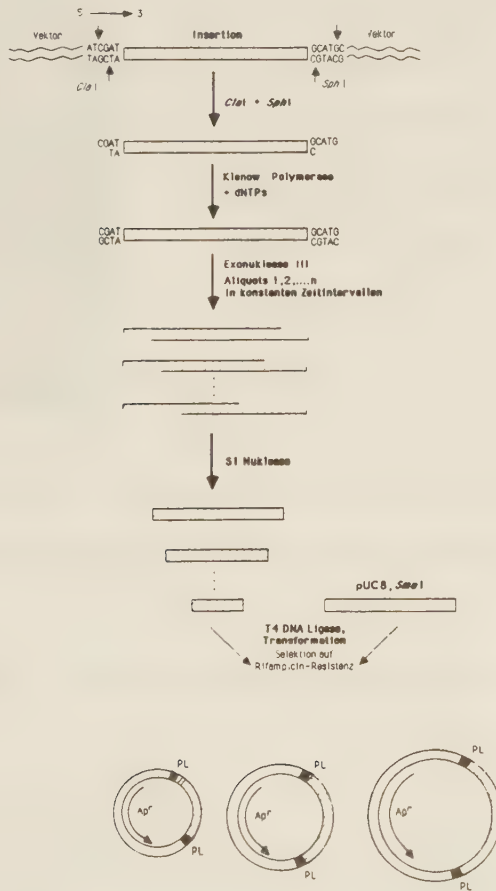


Fig. 8: Strategie zur Erzeugung von Deletionsklonen mit Exonuklease III + S1-Nuklease

Zur Durchführung vgl. laufenden Text von Kap. 4.3. bzw. die Beschreibung im Methodenteil (3.4.5.)

PL = Polylinker

4.3.2. Herstellung von Subklonen aus dem 3d-1 Fragment

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit den ExonukleaseIII-Deletionsklonen erbrachte starke Hinweise dafür, daß eines der beiden Enden des 3d-1-Fragmentes einen für die Rifampicin-Resistenz essentiellen Bereich verkörperte. Die Überlegung war nun, Subklone herzustellen, die zum einen überwiegend den 5'-, zum anderen den 3'-Bereich des 3d-1-Fragmentes aufweisen sollten. Eine erste Grobkartierung dieses Fragmentes ergab zwei interne *Bam*HI-Schnittstellen, denn die gelelektrophoretische Auftrennung des mit *Bam*HI hydrolysierten 3d-1-Fragments führte zu Fragmenten folgender Länge: a) 2850 bp, b) 2150 bp, c) 250 bp (Fig. 9). Die Addition dieser drei Subfragmente führt wieder zu der Länge (5250 bp), die dem ursprünglichen 3d-1-Fragment (5250 bp) entspricht. Die Anordnung der *Bam*HI-Stellen auf dem *Sph*I/*Cla*I-3d-1-Fragment konnte dadurch ermittelt werden, daß in einem Versuch der Gesamtklon 3d-1 mit *Sph*I+*Bam*HI, in einem anderen aber mit *Cla*I+*Bam*HI gespalten wurde. Im ersten Ansatz wurden Banden von der Länge 4350 bp (=Vektoranteil), 2850 bp und 2150 bp erzeugt (Fig. 9). Im zweiten Ansatz hingegen entstanden Fragmente der Länge 7200 bp, 2150 bp und 250 bp, die zwangsläufig zu der in Fig. 10 aufgezeichneten Anordnung der *Bam*HI-Stellen auf der 3d-1-Insertion führen.

Höchstwahrscheinlich entspricht die der *Cla*I-Stelle nahe *Bam*HI-Schnittstelle (1) genau einem Ende des klonierten zellulären *Sau*3AI-Fragments, denn der Abstand zwischen *Bam*HI (1) und *Cla*I beträgt 250 bp, und dies ist auch genau der Abstand, der im Wildtyp-Plasmid pBR322 der Entfernung zwischen der *Bam*HI- und der *Cla*I-Stelle entspricht.

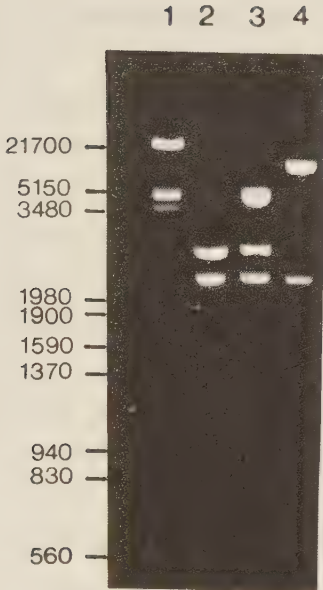


Fig. 9: Hydrolyse von Klon 3d-1 mit verschiedenen Restriktionsenzymen

Die Auftrennung der Spaltprodukte erfolgte über ein 0.8%-Agarosegel

Spur 1: *EcoRI/HindIII* gespalteene Lambda-DNA

Spur 2: 5.25 kb großes *ClaI/SphI*-Fragment, gespalten mit *BamHI*

Spur 3: Gesamtplasmid von Klon 3d-1, gespalten mit *SphI/ClaI*

Spur 4: Gesamtplasmid von Klon 3d-1, gespalten mit *ClaI/BamHI*

pBR322
Anteil

SphI

(2)
BamHI

(1)
BamHI

ClaI

pBR322
Anteil

2850bp

2150bp

250bp

Fig. 10: Anordnung der *BamHI*-Schnittstellen auf dem 3d-1-Fragment

Das 3d-1-Fragment wurde alsdann mit *BamHI* gespalten und die so erzeugten drei DNA-Fragmente über ein 1%iges "low melting point"-Agarosegel aufgetrennt. Das *SphI/BamHI*- (2850 bp) sowie das *BamHI/BamHI*-Fragment (2150 bp) wurde gemäß der Beschreibung in Kap. 3.3.7. isoliert und in zwei verschiedene Vektorsysteme subkloniert:

a) in den *SphI/BamHI* bzw. *BamHI* geschnittenen Vektor pBR322

b) in den *SphI/BamHI* bzw. *BamHI* gespaltenen Vektor pUC12

Die ligierte DNA wurde in kompetente JM83- (pUC-Derivate) bzw. in kompetente DHL-Zellen (pBR322-Derivate) transformiert und auf Ampicillin (100 µg/ml) selektioniert. Die erhaltenen Transformanden wurden durch Plasmid-Minipräparationen und Restriktionsanalysen auf ihre Insertionen hin überprüft. Die hinsichtlich der Insertionen positiven Klone wurden dann auf DHL-Agarplatten konstanter Ampicillin- (50 µg/ml), jedoch variierender Rifampicinkonzentration (5-50 µg/ml) überimpft und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Das Ergebnis dieser Versuche war eindeutig: alle Subklone mit dem insertierten, 2.15 kb großen *Bam*HI-Fragment sind, unabhängig vom verwendeten Vektorsystem, binnen 24 Stunden auf allen angebotenen Rifampicinkonzentrationen (5-50 µg/ml) angewachsen. Im Gegensatz dazu vermochten alle Subklone mit dem insertierten *Sph*I/*Bam*HI-Fragment nur bis zu einer Rifampicinkonzentration von 5 µg/ml anzuwachsen und zeigten somit dieselbe Sensitivität gegenüber Rifampicin wie die transformierten Wildtyp-Plasmide (vgl. Tab. 11). Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß dieses 2150 bp große *Bam*HI-Fragment den DNA-Bereich verkörpert, der für die Ausbildung der Rifampicin-Resistenz verantwortlich ist. Fortan wird der Klon mit dem 2150 bp *Bam*HI-Insert als Klon 3d^{rif} bezeichnet, und alle nachfolgenden Untersuchungen werden mit diesem Klon durchgeführt.

Die Erkenntnis, daß dieses, am 3'-Ende lokalisierte *Bam*HI-Fragment offensichtlich für die Expression der Resistenz verantwortlich ist, erklärt im nachhinein auch den negativen Befund aus den Deletionsexperimenten (vgl. 4.3.), denn hierbei wurden ja Deletionen erzeugt, die von beiden Enden her synchron erfolgten, so daß eben jedem getesteten Deletionsklon Bereiche fehlten, die für die Expression der Resistenz essentiell gewesen wären.

4.4. CHARAKTERISIERUNG DES KLONS 3d^{rif}

Die Einstufung der Rifampicin-Resistenz des Klon 3d^{rif} als plasmidkodiert und rpoB-unabhängig sollte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Desweiteren sollten noch einige biologische und physikalische Eigenschaften bestimmt werden.

4.4.1. Retransformierbarkeit des Klon 3d^{rif}

Um die Expression der Resistenz dieses DNA-Abschnittes auch in einem anderen Vektorsystem zu dokumentieren, wurde (wie oben bereits beschrieben) das 2.15 kbp *Bam*HI-Fragment auch in pUC12 kloniert. Nachfolgende Untersuchungen wurden mit beiden Vektorsystemen (pBR322 und pUC12) vorgenommen.

Die Plasmid-DNA von Klon 3d^{rif} wurde zum einen in kompetente DHL-, zum anderen in kompetente JM83-Zellen transformiert, auf ampicillinhaltige (100 µg/ml) DHL-Agarplatten selektioniert und im Anschluß daran wurden Einzelkolonien auf DHL-Agarplatten konstanter Ampicillin- (50 µg/ml), aber steigender Rifampicinkonzentration (0-100 µg/ml) überimpft (Tab. 11). Nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C war ein eindeutiges Wachstum bis 90 µg/ml festzustellen. Im Kontrollversuch wurden die Stämme JM83/pUC12 und DHL/pBR322 unter denselben Bedingungen inkubiert; diese zeigten jedoch nur bis zu einer Rifampicinkonzentration von maximal 5 µg/ml Wachstum (Tab. 11).

Bakterien- stamm	Rifampicinkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]										
	0	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90
pBR322/DH1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pUC12/JM83	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3d ^{rif} /JM83 (pUC12)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3d ^{rif} /DH1 (pBR322)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 11: Retransformation des Klons 3d^{rif} und Selektion auf Rifampicin

Die entsprechenden Plasmide wurden in die Stämme DH1 bzw. JM83 transformiert und zunächst auf Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) selektiert. Anschließend wurden von jedem Transformationsansatz jeweils 20 Kolonien auf DH1-Agarplatten konstanter Ampicillin- (50 $\mu\text{g/ml}$), aber steigender Rifampicinkonzentration (0-90 $\mu\text{g/ml}$) überimpft und 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

+ = eindeutiges Wachstum - = kein Wachstum

4.4.2. Bestimmung der RNA Polymeraseaktivität des Klons 3d^{rif} in Gegenwart von Rifampicin

Da eine Hemmung der RNA-Polymeraseaktivität von Rifampicin-Aufnahmemutanten das wichtigste Kriterium für die Einordnung in diese Resistenzklasse darstellt, wurde nun auch von dem Klon 3d^{rif} eine Analyse der RNA-Polymeraseaktivität in Gegenwart von Rifampicin erstellt (Tab. 12). Die Interpretation der erhaltenen Werte erlaubt eine klare Einordnung als Rifampicin-Aufnahmemutante. Vergleicht man das Ergebnis des Aktivitätstests des ursprünglichen Klons 3d-1 (5.25 kb-Insert) (Tab. 8) mit dem von Klon 3d^{rif} (2.15

kb-Insert), so zeigen beide RNA-Polymerasen die gleiche Sensitivität gegenüber Rifampicin. Dies bestätigt noch einmal, daß die Verkürzung des Klon 3d-1 keinen Einfluß auf das Ausmaß der Resistenz genommen hat. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß das 2150 bp lange *Bam*HI-Fragment von Klon 3d-1 die für die Ausbildung der Resistenz erforderliche genetische Information in vollem Umfang aufweisen muß. Ferner geht aus diesen Ergebnissen hervor, daß die Ursache der Rifampicin-Resistenz von Klon 3d^{rif} nicht in einer *rpoB*-Mutation liegt, sondern daß dieser wohl Veränderungen in der Rifampicin-Aufnahme zugrundeliegen.

Klon	Einbau von [³² P]UMP in Gegenwart von Rifampicin [µg/ml]							
	0 [µg/ml]		0.08 [µg/ml]		0.4 [µg/ml]		4 [µg/ml]	
	IpM	%	IpM	%	IpM	%	IpM	%
DH1/pBR322	6763	100	2637	39	1420	21	473	7
JM83/pUC12	5985	100	2274	38	1198	20	419	7
DH1/3d ^{rif} (pBR322)	7248	100	2391	33	1198	20	290	4
JM83/3d ^{rif} (pUC12)	6123	100	2265	37	1224	20	620	10

Tab. 12: Hemmung der RNA Polymeraseaktivität von Klon 3d^{rif} durch Rifampicin

Die Durchführung des Aktivitätstests der RNA Polymerase in Gegenwart unterschiedlicher Rifampicin-Konzentrationen erfolgte gemäß der Beschreibung in Kap. 3.2. Eine 50%-Hemmung der RNA Polymeraseaktivität trat bei einer Rifampicin-Konzentration von < 0.08 µg/ml ein.

4.4.3. Wachstumskurven von Klon 3d^{rif} unter Einfluß von Rifampicin

Interessant ist die Frage, welchen Einfluß Rifampicin auf das Wachstumsverhalten von Klon 3d^{rif} nimmt, und ob das klonierte Resistenzgen im Vergleich zu dem des Ausgangsstammes (10/lt) Unterschiede hinsichtlich des Wachstums zeigen würde. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde einer logarithmisch wachsenden Kultur des Stammes 3d^{rif} bei einer $OD_{600nm} = 0.3$ Rifampicin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (Fig. 11) und das Wachstum photometrisch verfolgt. Klon 3d^{rif} zeigt eine voll ausgeprägte Resistenz gegenüber Rifampicin bis zu einer Konzentration von 80 µg/ml. Erst bei 100 µg/ml tritt eine Hemmwirkung in Form verlangsamten Wachstums ein. Bei 130 µg/ml ist eine vollständige Hemmung des Wachstums zu verzeichnen. Im Vergleich zum Wachstumsverlauf im rifampicinfreien Medium bewirkt Rifampicin bis zu einer Konzentration von 80 µg/ml nur eine minimale Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit. Die beim Ausgangsstamm 10/lt feststellbare einstündige lag-Phase (Phase verzögerten Wachstums) nach Zusatz des Antibiotikums (Fig. 3) konnte bei Klon 3d^{rif} bestätigt werden. Das klonierte Rifampicin-Resistenzgen vermittelt also unter Rifampicineinfluß dasselbe Wachstumsverhalten wie das chromosomal kodierte des Stammes 10/lt.

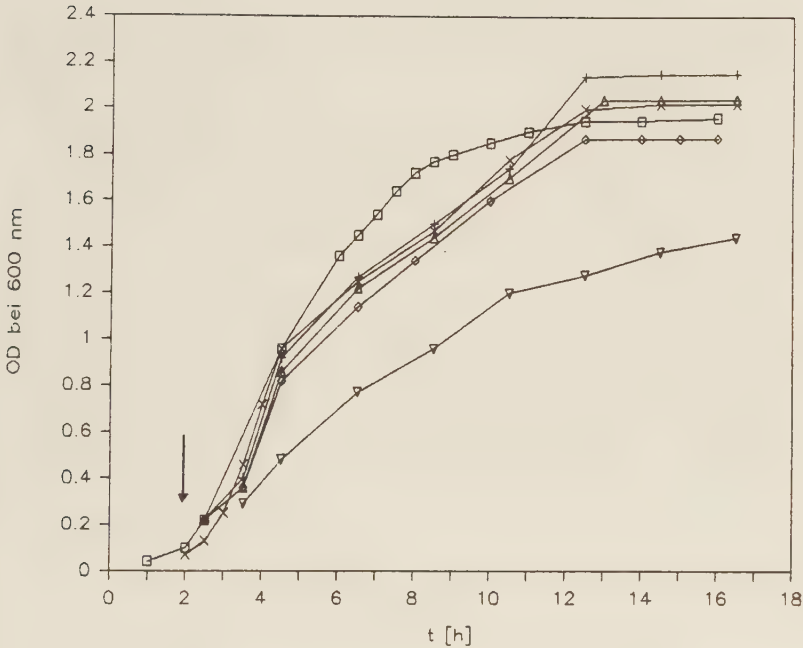


Fig. 11: Wachstumskurven des Klons 3d^{rif}

Wachstumskurven des Klons 3d^{rif} wurden in LB-Medium bei konstanter Ampicillin- (50 µg/ml), aber variierender Rifampicinkonzentration (0-100 µg/ml) gemessen (vgl. Kap. 3.1.6.). Bei einer OD_{600nm} = 0.3 (durch Pfeil gekennzeichnet) wurde aus einer Stammlösung von 10 mg/ml (in Methanol) Rifampicin in unterschiedlichen Mengen zugegeben:

□ = ohne Rifampicin x = 10 µg/ml △ = 30 µg/ml + = 50 µg/ml
 ◇ = 80 µg/ml ▽ = 100 µg/ml

4.4.4. Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin

Ein wichtiger Aspekt bei der Klassifizierung der Resistenz stellt die Untersuchung der minimalen Hemmkonzentration an Rifampicin dar (Tab. 13). Sie beträgt bei Klon 3d^{rif} 100 µg/ml. Hierbei spielt es keine Rolle, ob pUC12 oder pBR322 als Vektor für das Resistenzgen eingesetzt wird. Im Vergleich zum Ausgangsstamm 10/lt liegt die minimale Hemmkonzentration von 3d^{rif} um 20 µg/ml niedriger (siehe Tab. 1), der Resistenzfaktor aber um den Faktor 2 höher. Der Grund dafür liegt in der unterschiedlichen Hemmkonzentration der als Bezugsgrößen ausgewählten *E.coli*-Stämme (im Falle von 10/lt ist dies AB1157, bei 3d^{rif} ist dies *E.coli* DH1 bzw. JM83). Keinen Unterschied findet man zwischen Klon 3d-1 (vgl. 4.2.3.) und Klon 3d^{rif} hinsichtlich der minimalen Hemmkonzentration und des Resistenzfaktors.

Klon	Minimale Hemmkonzentration [µg/ml] Rifampicin	Resistenz- faktor
DH1/pBR322	5	1
JM83/pUC12	5	1
DH1/3d ^{rif} (pBR322)	100	20
JM83/3d ^{rif} (pUC12)	100	20

Tab. 13: Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin für Klon 3d^{rif}

1 µl von Übernachtskulturen der im ampicillinhaltigen (100 µg/ml) LB-Medium gewachsenen Klone wurde auf LB-Agarplatten mit konstanter Ampicillin- (50 µg/ml), jedoch steigender Rifampicinkonzentration (0-100 µg/ml) ausgestrichen und nach 20 stündiger Bebrütung bei 37°C auf Wachstum kontrolliert.

4.4.5. Längenbestimmung und Restriktionskartierung von Klon 3d^{rif}

Zur exakten Längenbestimmung der Insertion von Klon 3d^{rif} wurde das über Dichtegradientenzentrifugation isolierte Plasmid mit *Bam*HI hydrolysiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Das *Bam*HI-Fragment wurde aus niedrigschmelzender Agarose (siehe 3.3.7.) isoliert und die Fragmentlänge gelelektrophoretisch unter Verwendung geeigneter Längenstandards zu 2150 ± 20 bp bestimmt (Fig. 12).

Eine physikalische Kartierung von DNA-Bereichen mittels Restriktionsendonukleasen ist notwendig, um mithilfe der ermittelten Positionen von Restriktionsenzymstellen Funktionsanalysen oder Subklonierungen definierter DNA-Bereiche durchführen zu können. Für eine Feinkartierung des 2150 bp großen *Bam*HI-Fragments erwiesen sich die Restriktionsendonukleasen mit Tetranukleotid-Erkennungssequenz als relativ schwierig, denn bei simultaner Verdauung mit zwei oder mehreren Enzymen erhielt man Fragmentmuster, die sehr komplex und kaum zu interpretieren waren. Bei Einsatz von Enzymen mit Hexanukleotid-Erkennungssequenz ergaben sich jedoch überschaubare und vor allem interpretierbare Fragmentmuster. In Tab. 14 sind die Restriktionsenzyme mit Hexanukleotidsequenz zusammengefaßt, welche auf dem 2150 bp großen *Bam*HI-Fragment Schnittstellen zeigen.

Zur Bestimmung der Anordnung der Schnittstellen wurde das *Bam*HI-Fragment zum einen durch Einzelschnitte der betreffenden Restriktionsenzyme, zum anderen durch simultane Schnitte verschieden kombinierter Restriktionsenzyme hydrolysiert (Fig. 12 und 13).

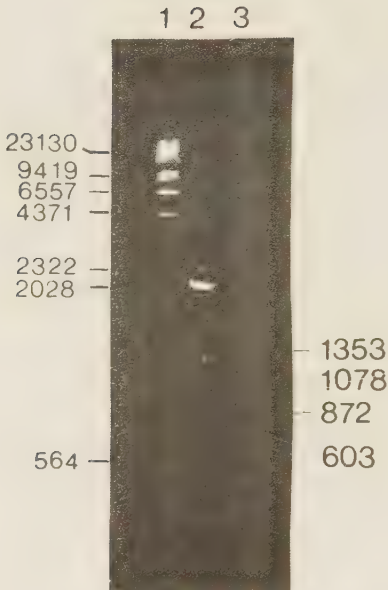


Fig. 12

Fig. 12: Längenbestimmung der Insertion des Plasmids von Klon 3d^{rif}

Das isolierte *Bam*HI-Fragment von Klon 3d^{rif} wurde über ein 0.8% Agarosegel aufgetrennt. Als Längenstandard dienten ØX174-DNA, geschnitten mit *Hae*III und Lambda-DNA, geschnitten mit *Hind*III.

Spur 1: DNA-Längenstandard (Lambda-DNA/*Hind*III)

Spur 2: *Bam*HI-Fragment von Klon 3d^{rif}

Spur 3: DNA-Längenstandard (ØX174-DNA/*Hae*III)

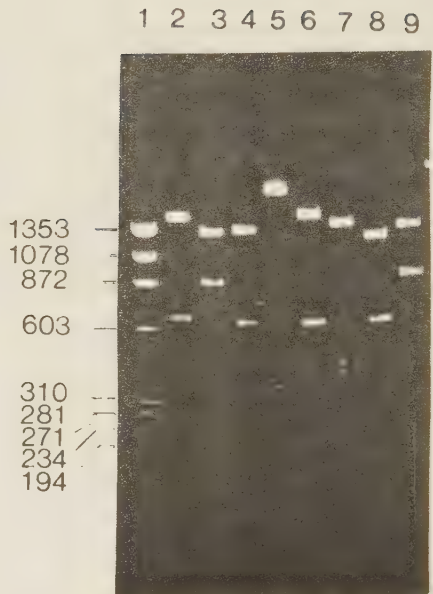


Fig. 13

Fig. 13: Restriktionsanalyse des *Bam*HI-Fragments von Klon 3d^{rif}

Je 1 µg des über "low melting" Agarose isolierten *Bam*HI-Fragments wurde in der angegebenen Kombination von Enzymen gespalten und über ein 1% Agarosegel aufgetrennt. Als Längenstandard wurde ØX174 DNA, geschnitten mit *Hae*III, eingesetzt.

Spur 1: ØX174-DNA/*Hae*III

Spur 2: *Dra*I

Spur 3: *Hind*III

Spur 4: *Dra*I/*Hind*III

Spur 5: *Acc*I

Spur 6: *Nru*I

Spur 7: *Xmn*I

Spur 8: *Acc*I/*Nru*I

Spur 9: *Xmn*I/*Hind*III (die größte Bande ist auf unvollständige Hydrolyse zurückzuführen)

Enzym	Erkennungs- sequenz	Zahl der Schnitt- stellen	Fragmentgrößen (bp)
<i>DraI</i>	TTTAAA	2	1450, 650, 50
<i>HindIII</i>	AAGCTT AG	2	1250, 850, 45
<i>AccI</i>	GT AC CT	2	1780, 200, 165
<i>NruI</i>	TCGCGA	2	1450, 600, 100
<i>XmnI</i>	GAA(N) ₄ TTC	2	

Tab. 14: Restriktionsenzym-Schnittstellen mit 6 bp-Erkennungssequenz auf dem *Bam*HI-Fragment von Klon 3d^{rif}

Um die Argumentation für die Aufstellung der Restriktionskarte verständlich zu machen, ist der nachfolgend beschriebenen Kartierung des isolierten *Bam*HI-Fragments die endgültige Restriktionskarte vorangestellt (Fig. 14).

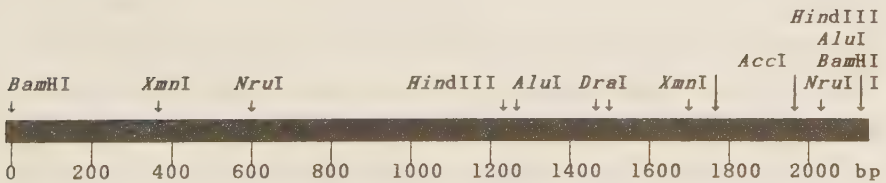


Fig. 14: Restriktionskarte des *Bam*HI-Fragments von Klon 3d^{rif}

Die in Fig. 14 aufgezeichnete Anordnung der Restriktionsschnittstellen ergibt sich aus folgenden Überlegungen:

1. *DraI* erzeugt Fragmente der Längen 1450, 650 und 50 bp, *HindIII* dagegen Fragmente der Längen 1250, 850 und 45 bp. Bei einer Doppelverdauung des *BamHI*-Fragments mit *DraI* und *HindIII* erhält man 1250, 620, 200 und 2x50 bp (Doppelbande) große Fragmente. Das 1250 bp-Fragment aus der Doppelverdauung zeigt die gleiche Mobilität wie das Fragment aus der Verdauung mit *HindIII* allein. Das 1450 bp-Fragment der *DraI*-Spaltung wird offenbar von einer darin gelegenen *HindIII*-Stelle geschnitten, da auch ein kleines Fragment (200 bp) entsteht, welches auch durch Subtraktion von 1450 bp (*DraI*-Stelle) - 1250bp (*HindIII*-Stelle) = 200bp erhalten wird. Da auch das ursprünglich 850 bp große Fragment aus der *HindIII*-Verdauung im Doppelansatz auf 620 bp verkürzt wird, ist die Lokalisierung einer *DraI*-Schnittstelle innerhalb dieses DNA-Bereiches zwingend.

2. Die Hydrolyse mit *AccI* führt zur Bildung von Bruchstücken folgender Längen: 1780, 200 und 170 bp. Die Spaltung mit *NruI* bewirkt die Entstehung folgender Fragmentlängen: 1450, 600 und 100 bp. Die Doppelverdauung mit *AccI*+*NruI* erzeugt Fragmente der Längen 1170, 600, 170 und 2x 100 bp (Doppelbande). Beide großen Fragmente der jeweiligen Einzelverdauungen (1780 bp beim *AccI*- und 1450 bp beim *NruI*-Schnitt) verschwinden bei einer gleichzeitigen Hydrolyse mit diesen beiden Enzymen; dies ist ein Indiz dafür, daß beide Spaltstellen überlappend sind: *NruI* schneidet innerhalb des von *AccI* erzeugten 1780 bp-Fragments und *AccI* wiederum spaltet innerhalb des von *NruI* erzeugten 1450 bp-Fragments. Das 1170 bp-Fragment erklärt sich durch Subtraktion von 1780 bp (aus *AccI*-Schnitt) - 600 bp (aus *NruI*-Schnitt). Das 165 bp-Fragment des *AccI*-Schnitts bleibt bei der Doppelhydrolyse intakt. Da das *AccI*-*BamHI*-Fragment (200 bp) verschwindet, muß innerhalb dieses Fragments die zweite

NruI-Spaltstelle lokalisiert sein, womit auch die Entstehung der 100 bp-Doppelbande erklärbar ist.

3. Spaltet man mit *XmnI*, so bilden sich Bruchstücke der Länge: 1330, 440 und 390 bp. Bei der Hydrolyse mit *HindIII* erzielt man Fragmente der Länge 1250, 850 und 45 bp. Bei einer gleichzeitigen Spaltung von *HindIII*+*XmnI* entstehen folgende Fragmente: 870, 450, 400, 385 und 40 bp. Da hierbei das 1250 bp-Fragment aus der Verdauung mit *HindIII* verschwindet, muß innerhalb dieses Fragments eine *XmnI*-Schnittstelle, und zwar an einem Ende lokalisiert sein, da Fragmente der Länge 870 und 380 bp (entspricht *XmnI*-Stelle) entstehen, welche sich wieder zu dem 1250 bp-Fragment addieren lassen. Auch das ursprüngliche 1330 bp-Fragment aus der *XmnI*-Verdauung verschwindet im Doppelansatz, so daß innerhalb dieses *XmnI*-*XmnI*-Fragments eine *HindIII*-Stelle sitzen muß. Nachdem hierbei ein 870 bp-Fragment entsteht, muß *HindIII* das von *XmnI* erzeugte 1330 bp-Fragment zu $1330 - 870 = 460$ bp schneiden. Da auch das bei der alleinigen Verdauung mit *XmnI* entstehende Randfragment (450 bp großes *XmnI*-*BamHI*-Fragment) bei der Doppelverdauung verschwindet und das 850 bp große *HindIII*-Fragment aus der Einzelspaltung mit *HindIII* ebenfalls eine Veränderung erfährt (wird kleiner), muß die zweite *XmnI*-Stelle in diesem *HindIII*-Fragment sitzen. Dies läßt sich auch durch Addition der entstandenen Bruchstücke bestätigen: 450 bp (*HindIII*-*BamHI*) + 400 bp (*HindIII*/*XmnI*).

Die mittels Restriktionskartierung ermittelte Anordnung der Restriktionsschnittstellen konnte durch die spätere Sequenzanalyse bestätigt werden.

Um weitere Information über Restriktionsschnittstellen zu erzielen, wurde das *BamHI*-Fragment mit einer Serie von Restriktionsenzymen mit einer Tetranukleotid-Erkennungssequenz gespalten und die

Größe der entstandenen Bruchstücke bestimmt. Für die Analyse wurden die Enzyme *HaeIII*, *Sau3AI*, *MspI*, *RsaI*, *MboII* und *TaqI* eingesetzt. Nach Hydrolyse des isolierten *BamHI*-Fragments mit dem entsprechenden Enzym wurde das entstandene Fragmentgemisch elektrophoretisch über ein 1.6%-Agarosegel aufgetrennt und die Größe der Fragmente durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard (*HaeIII* gespaltene pBR322-DNA) bestimmt (Fig. 15). Die Anzahl der Restriktionsschnittstellen und die ermittelte Größenverteilung der Subfragmente sind in Tab. 15 zusammengestellt.

Enzym	Erkennungssequenz	Zahl der Schnittstellen	Größe der Fragmente (bp)
<i>HaeIII</i>	GGCC	9	500,400,350,280,240,170 und 3 nicht auftrennbare Banden
<i>MboII</i>	GAAGA	9	920,420,270,220,110 und 4 nicht auftrennbare Fragmente
<i>MspI</i>	CCGG	11	650,350,280,180,150,120,80,60 und 3 nicht auftrennbare Banden
<i>RsaI</i>	GTAC	5	760,550,500,240,50,30
<i>TaqI</i>	TCGA	6	530,500,350,300,270,130
<i>Sau3AI</i>	GATC	4	1370,475,225,65

Tab. 15: Schnittstellen von Restriktionsendonucleasen mit Tetranukleotidsequenz auf dem *BamHI*-Fragment von 3d^{11f}

Durch die Anzahl der aus den jeweiligen Enzymspaltungen erhaltenen Bruchstücke (vgl. Fig. 15) wurde auf die Zahl der Schnittstellen rückgeschlossen, jedoch konnten manche Schnittstellen wegen mangelnder Auftrennung kleiner Fragmente nicht erkannt werden. Insgesamt mußte jedoch die Anzahl und die Größenbestimmung der Bruchstücke in Ordnung gehen, denn die Addition der Subfragmente jedes Restriktionsansatzes führt wieder zu der Größe des nativen Fragments. Die später durchgeführte Sequenzanalyse bestätigte die Ergebnisse der Restriktionsverdauungen (vgl. 4.5.).

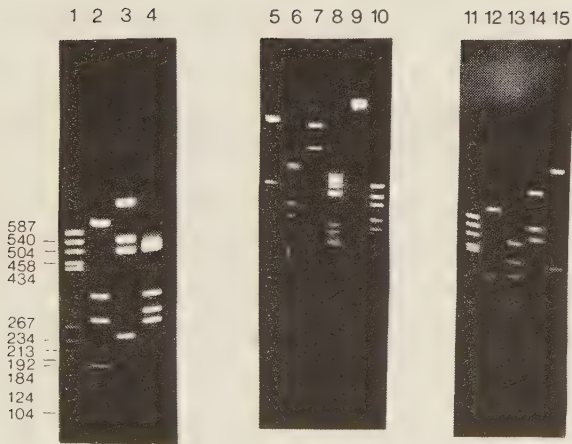


Fig. 15: Restriktionsanalyse des *Bam*HI-Fragments von Klon 3drif

Jeweils 1 µg des isolierten *Bam*HI-Fragments wurde mit dem angegebenen Restriktionsenzym gespalten und über ein 1.6%-Agarosegel aufgetrennt. Als DNA-Längenstandard wurde mit *Hae*III gesplattene pBR322-DNA verwendet.

Spur 1: DNA-Marker	Spur 6: <i>Msp</i> I	Spur 11: DNA-Marker
Spur 2: <i>Msp</i> I	Spur 7: <i>Hind</i> III	Spur 12: <i>Msp</i> I
Spur 3: <i>Rsa</i> I	Spur 8: DNA-Marker	Spur 13: <i>Hae</i> III
Spur 4: <i>Taq</i> I	Spur 9: ungespalten	Spur 14: <i>Rsa</i> I
Spur 5: <i>Sau</i> 3AI	Spur 10: <i>Hae</i> III	Spur 15: <i>Mbo</i> II

4.5. SEQUENZIERUNG DES RIFAMPICIN-RESISTENZGENS VON KLON 3d^{rif}

Die Bestimmung der vollständigen Nukleotidsequenz des Resistenzgens ist eine notwendige Voraussetzung für die Aufklärung der molekularen Ursache der Rifampicin-Resistenz. Sie soll zudem Information über kodierte Proteine und Regulationsbereiche auf diesem DNA-Abschnitt liefern.

Für die vorliegende Sequenzierungsstudie wurden keine konventionelle Methoden gewählt, wie es z.B. das Maxam-Gilbert-Verfahren (Maxam and Gilbert, 1980) verkörpert. Hierbei werden überlappende, die ganze DNA abdeckende Restriktionsfragmente isoliert und diese auf zeitintensive Weise direkt sequenziert. Eine andere, konventionelle Strategie besteht in der Klonierung zufallsmäßig erzeugter Fragmente (erzeugt durch Ultraschall-Behandlung der DNA: Deininger, 1983, oder durch limitierte DNaseI-Behandlung: Anderson, 1981) in geeignet präparierte M13-Vektoren (Messing *et al.*, 1981) und anschließender Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Letztere Methoden erzeugen zwar eine große Anzahl überlappender oder benachbarter Fragmente, oft ist jedoch eine zusätzliche Sequenzinformation von klonierten Restriktionsfragmenten notwendig, um die Sequenzdaten beider Stränge abzusichern. Weitere Strategien existieren sowohl hinsichtlich der Aufteilung der DNA in kleine, sequenzierbare DNA-Fragmente (Frischauf *et al.*, 1980; Messing *et al.*, 1981) als auch hinsichtlich der Erzeugung überlappender Deletionsklone (Hong, 1982; Barnes and Bevan, 1983; Henikoff, 1984). Jedoch führen auch diese Strategien lediglich zu einer zufallsmäßigen Sequenzierung der Klone.

Die im folgenden angestrebte Sequenzierungsstrategie basiert auf dem gut etablierten Didesoxynukleotid-Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung von M13 Vektoren (Messing *et*

al., 1981), wobei mit Hilfe "template"-spezifischer Oligonukleotide in "primer-extension"-Reaktionen (Hunkapiller *et al.*, 1984) die Sequenzinformation ermittelt werden sollte. Synthetische Oligonukleotide sind mittlerweile durch Automatisierung der DNA-Synthese leicht erhältlich, so daß eine zügige Durchführung dieser Strategie gewährleistet sein müßte.

4.5.1. Sequenzanalyse mittels "primer-extension"

Das Prinzip dieses Verfahrens sieht vor, zunächst unter Verwendung des M13 Universalprimers die Sequenz des Fragmentanfangs zu bestimmen. Die erhaltene Sequenzinformation dient dann als Grundlage für die Synthese eines Oligonukleotides, welches dann als Primer für die Sequenzanalyse des folgenden DNA-Bereiches eingesetzt wird. Diese "primer-extension" wird dann solange weitergeführt, bis die vollständige Sequenzinformation der Insertion bekannt ist. In Anlehnung daran wurde das *Bam*HI-Fragment von Klon 3drif in die *Bam*HI-Stelle der RF DNA des Phagen M13mpl0 (Messing and Vieira, 1982) kloniert und nach Transfektion von *E.coli* JM103 wurde die einzelsträngige, rekombinante Phagen DNA gemäß der Beschreibung in Kap. 3.3.5. isoliert. Die Überprüfung der Größe der Insertion geschah durch Restriktionsverdauung der rekombinanten M13mpl0 RF DNA mit *Bam*HI und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung. Die aufgrund der Klonierung möglichen zwei Orientierungen der Insertion wurden durch einen Komplementaritätstest ("C-Test") (Messing *et al.* 1981; vgl. Kap. 3.5.5.) festgestellt. Dieser Test macht sich die Tatsache zunutze, daß zwei rekombinante Phagen, die dasselbe Fragment in entgegengesetzter Orientierung beherbergen, über die klonierten Bereiche zueinander komplementär sind. Unter "Annealing"-Bedingungen bilden die beiden Phagen DNAs ein achter-

förmiges Dimer, welches bei der gelelektrophoretischen Auftrennung eine geringere Mobilität zeigt als die beiden einzelsträngigen DNA's selbst. Insgesamt 12 rekombinante Phagen mit einheitlicher Orientierung der Insertion wurden ausgewählt und für die Sequenzierungsreaktionen als Phagen-Stammlösung konserviert.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden nach dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren (siehe Kap. 3.6.) durchgeführt. Hierbei wird ein "template" spezifisches Oligonukleotid (Primer) an die einzelsträngige Phagen-DNA hybridisiert und in 4 Einzelreaktionen der Primer/Template-Komplex zusammen mit dem Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase, allen 4 Desoxynukleotidtriphosphaten und je einem Didesoxynukleotidtriphosphat inkubiert, so daß DNA-Ketten verschiedener Längen entstehen; denn es kommt an der Stelle zum Kettenabbruch, wo ein Didesoxynukleotid, welchem die 3'OH-Gruppe fehlt, in die wachsende Kette eingebaut wird. Nach Denaturierung der Proben mit Formamid erfolgt die Auftrennung der Fragmente über ein denaturierendes Polyacrylamidgel.

In Anlehnung an die oben beschriebene und in Fig. 16 aufgezeichnete Sequenzierungsstrategie wurde unter Verwendung des M13 Universalprimers, welcher komplementär zu unmittelbar vor dem Polylinker gelegenen M13-Sequenzen ist, die Nukleotidsequenz des Randbereiches des *Bam*HI-Fragments ermittelt. In der ersten Sequenzierungsreaktion konnten 300 Basen eindeutig bestimmt werden. Als Primer für die zweite Reaktion wurde ein Oligonukleotid verwendet, dessen Zusammensetzung der Sequenzinformation der vorausgegangenen Sequenzierung entstammte. Der Primer darf nicht genau dem Ende der vorher bestimmten Sequenz entsprechen, um bei der darauffolgenden Sequenzierung eine Kontrollmöglichkeit für den richtigen Bindungs-

ort des Primers zu haben. Denn die im ersten Experiment am Ende gelegenen Basen müssen im zweiten Ansatz wieder am Anfang der Sequenz zu finden sein. Ein wichtiger Parameter für die Wahl der geeigneten Nukleotidabfolge besteht im Homologiegrad des Primers zur Vektor-DNA, denn weitere mögliche Bindungsstellen des potentiellen Primers auf der Vektor-DNA würde zu einem Hintergrund führen, der die Sequenzanalyse beeinträchtigen oder sogar verfälschen würde. Um diese Bedingungen zu erfüllen, wurden mit mehreren in Frage kommenden Nukleotidsequenzen eine Computeranalyse (Beckman: Microgenie) durchgeführt, wobei ein 19mer Oligonukleotid (bezeichnet als W-1) mit der Sequenz 5'-AAATACATGTTGGTTTCGC-3' (Pos. 222-241) den geringsten Homologiegrad mit der M13 Nukleotidsequenz aufwies. Dieses Oligonukleotid wurde als Primer für die nächste Sequenzierungsrunde eingesetzt, wobei die nächsten 320 Basen bestimmt werden konnten. Unter Befolgung obig beschriebener Auswahlkriterien wurde die Nukleotidabfolge 5'-AATCCAGCGTTTGTTA-3' (Pos. 517-532) als beste Sequenz für die Verwendung als Primer (bezeichnet als W-2) bestimmt und dann auch im dritten Sequenzierungsansatz eingesetzt. Auch wenn in diesem Sequenzierungsschritt weitere 300 Basen ermittelt werden konnte, wurde diese Strategie an dieser Stelle abgebrochen, nachdem sich herausstellte, daß das *Bam*HI-Fragment nicht stabil im M13 Vektor integriert blieb. Denn nach wiederholter Transformation vom *E.coli* JM103 mit dieser rekombinierten RF-DNA ergab die Restriktionsanalyse der isolierten RF-DNA unterschiedlich große Deletionen der Insertion, deren Umfang in den jeweiligen Isolaten zwischen 100 und 200 bp schwankte (nicht gezeigt). Die Instabilität der Matrize war nun ausschlaggebend dafür, diese Strategie nicht mehr weiter zu verfolgen, da das M13-System bei größeren Insertionen, wie im vorliegenden Fall, offenbar nicht die Gewähr einer korrekten Replikation bieten kann und

somit auch eine ordnungsgemäße Bestimmung der Nukleotidsequenz nicht mehr gegeben ist. Insgesamt konnten mittels dieser Strategie (Fig. 16) die Nukleotidabfolge von 850 Basen eines Stranges sequenziert werden (Fig. 17).

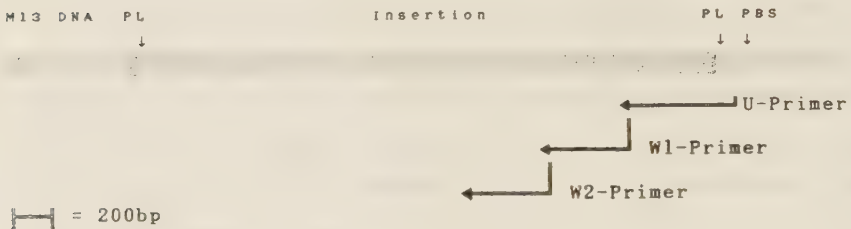


Fig. 16: Sequenzstrategie zur Nukleotidbestimmung des *Bam*HI-Fragments von Klon 3d^{rif} mittels "primer-extension"

Das *Bam*HI-Fragment von Klon 3d^{rif} wurde in die *Bam*HI-Stelle von M13mpl0 kloniert. Die Sequenzreaktionen wurden unter Verwendung verschiedener Primer an der einzelsträngigen rekombinanten M13mpl0 Phagen DNA vorgenommen. Der U-Primer (Universalprimer) hatte die Sequenz 5'-GTAAACGACGGCCAGT-3'. Die Sequenz des W1-Primers wurde der vorausgegangenen Nukleotidbestimmung entnommen und lautet: 5'-AAATACATGTTGGTTTCGC-3', die Sequenz des W2-Primers hat die Nukleotidabfolge 5'-AATCCAGCGTTTGTTA-3'.

PL = Polylinker, PBS = Primer-Bindungsstelle

Die nachfolgend durchgeführte Klonierung kleinerer Subfragmente aus dem Gesamtfragment in kompatible Stellen des M13mpl0 waren ebenfalls nicht zufriedenstellend, denn z.B. das im M13mpl0 klonierte *Alu*I-*Dra*I(1)-, das *Hind*III-*Dra*I(1)- sowie das *Dra*I-*Acc*I(1)-Fragment (vgl. Fig. 13) konnte nach Transfektion von *E.coli* JM103 nicht mehr in der ursprünglichen Größe erhalten werden; auch in

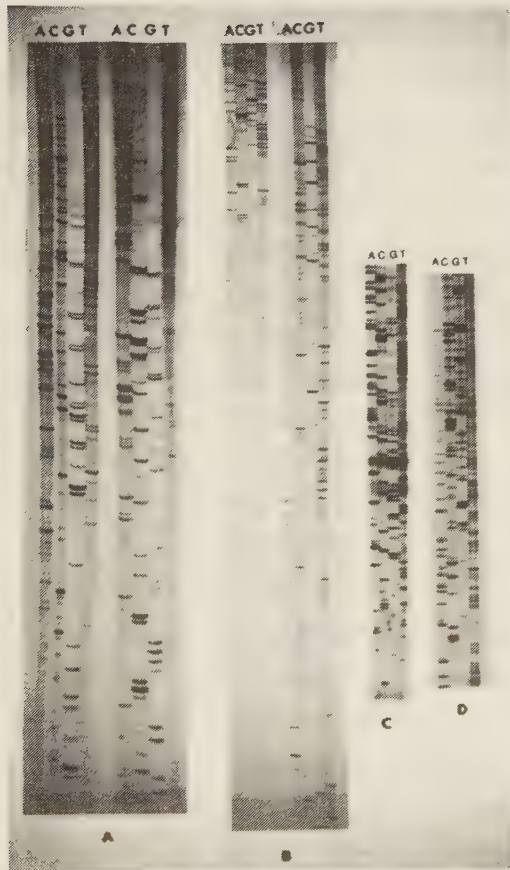


Fig. 17: Bestimmung der Nukleotidsequenz eines Teils des 3d^{rif}-Gens durch M13-Dideoxy-Sequenzierung mit verschiedenen Oligonukleotiden als "Primer"

Das 2.15 kb-Fragment von Klon 3d^{rif} wurde in M13mpl0 kloniert und die Sequenzreaktion an der einzelsträngigen Phagen-DNA unter Verwendung verschiedener Primer durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte über ein 6%-Sequengel.

- A: Sequenzanalyse mit dem Universalprimer
- B: Sequenzanalyse mit dem synthetischen Primer W-1; zwei unterschiedlich lange Elektrophoresezeiten.
- C: Sequenzanalyse mit dem synthetischen Primer W-2; kurze Elektrophoresezeit.
- D: Sequenzanalyse mit dem synthetischen Primer W-2; längere Elektrophoresezeit.

diesen Fällen waren die Deletionen von unterschiedlichem Ausmaß (20-130 bp). Diese Deletionsphänomene machten das M13 Klonierungs- und Sequenzierungssystem für unsere Experimente unbrauchbar. Daß bestimmte DNA-Sequenzen (viele bakterielle Promotoren, hoch repetitive Sequenzen z.B.), nicht stabil in Vektoren kloniert und nicht korrekt repliziert werden können, wurde auch von anderen Autoren beobachtet (Chen and Seeburg, 1985). Mögliche Mechanismen der Deletionsbildung in vitro konstruierter DNA wurde ebenfalls von mehreren Autoren diskutiert (Albertini *et al.*, 1982; Collins, 1980; Glickmann and Ripley, 1984; Michel and Ehrlich, 1986).

4.5.2. Selektive Klonierung von Subfragmenten als Grundlage für eine Sequenzierungsstrategie

Da die Methode des "Entlangwanderns" auf der DNA nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde die Strategie der Klonierung von Subfragmenten aus dem *Bam*HI-Fragment in einen Plasmid-Vektor gewählt. Eine reine Shotgunklonierung ist aus folgenden Gründen nicht erstrebenswert:

- 1) Der Einbau des dem Vektor angebotenen DNA-Gemisches läßt sich nicht steuern, so daß sich in der Populationen der Klone zwar ein heterogenes Gemisch an Insertionen findet, dabei jedoch ein bevorzugter Einbau besonders leicht replizierbarer Sequenzen zu verzeichnen ist.
- 2) Weniger gut klonierbare Fragmente sind wegen ihrer Unterrepräsentierung schwer zu selektionieren und fehlen dann bei nachfolgenden Sequenzanalysen.

Aus dieser Überlegung heraus wurde eine Strategie verfolgt, welche, ohne vorherige Kenntnis der Lage der Restriktionsenzym-

Schnittstellen, eine gezielte Subklonierung isolierter Restriktionsfragmente gewährleistet. Das Prinzip dieses Verfahrens liegt darin, das Ausgangsfragment mit 3 oder 4 verschiedenen Restriktionsenzymen mit Tetranukleotid-Erkennungssequenz in Parallelansätzen zu spalten, die daraus sich ergebenden Fragmente elektrophoretisch aufzutrennen und einzeln zu isolieren. Die isolierten Fragmente werden danach einzeln in Vektoren mit kompatibler Schnittstelle kloniert und der rekombinante Klon anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen. Dieses Verfahren kreiert eine genügend hohe Anzahl überlappender Fragmente, welche den ganzen DNA-Bereich abdecken. Besonders effizient gestaltet sich dieses Verfahren, wenn man Plasmide als Vektoren verwendet und die Nukleotidsequenz über die Technik der Plasmidsequenzierung ermittelt (Wallace, 1981; Chen and Seeburg, 1985); denn mit dieser Sequenzierungstechnik eröffnet sich die Möglichkeit, unter Verwendung derselben Matrize, die Sequenz beider Stränge zu ermitteln, indem man zwei, zu den jeweiligen DNA-Strängen komplementäre Oligonukleotide als Primer (Universal- und Reverser Primer) für die Sequenzanalyse nach dem Didesoxyverfahren (Sanger *et al.*, 1977) einsetzt.

Die soeben beschriebenen Vorzüge dieser Strategie und die in Kap. 4.5.1. aufgezeigten Nachteile und Unwägbarkeiten des M13-Systems waren ausschlaggebend dafür, das Plasmid pUC12 (Messing *et al.*, 1982) als Vektor für die Klonierungs- und Sequenzierungsexperimente zu wählen. Es sei auch darauf hingewiesen, daß das einfach handbare Plasmidsystem aufgrund der Möglichkeit, mit geeigneten Primern beide Stränge zu sequenzieren, nicht nur einen Klonierungsschritt, sondern auch das oft problematische Arbeiten mit dem M13 Bakteriophagen umgeht.

Das *Bam*HI-Fragment von Klon 3drif wurde über niedrigschmelzende Agarose isoliert und in Parallelansätzen mit den Restriktionsenzymen *Hae*III, *Msp*I, *Rsa*I, *Sau*3A und *Taq*I hydrolysiert. Die erhaltenen Fragmentgemische wurden über ein 1,6%-Agarosegel aufgetrennt (Fig. 15) und die einzelnen Bruchstücke mittels DEAE-Membranfiltertechnik (siehe Kap. 3.3.7.) isoliert. Aliquots der isolierten Fragmente wurden zusammen mit DNA-Längenstandard über ein 1,6%-Agarosegel aufgetrennt, um einerseits eine Konzentrationsabschätzung der DNA-Menge erstellen zu können und andererseits die korrekte Zuordnung der einzelnen Fragmente zum bekannten Restriktionsmuster bestätigt zu wissen.

Die durch Verdauung mit *Hae*III (GG↓CC) bzw. *Rsa*I (GT↓AC) entstandenen Fragmente weisen glatte Enden auf und wurden in Einzelansätzen in den kompatiblen, mit *Sma*I (CCC↓GGG) linearisierten und alkalischer Phosphatase dephosphorylierten Vektor puCl2 ligiert. Die durch Verdauung mit *Taq*I (T↓CGA) bzw. *Msp*I (C↓CGA) erhaltenen Fragmente wurden in die kompatible *Acc*I-Stelle (GT↓CGAC) und die durch Hydrolyse mit *Sau*3AI (G↓ATC) erzeugten Fragmente wurden in die kompatible *Bam*HI-Stelle (G↓GATCC) des dephosphorylierten Vektors puCl2 ligiert. Die rekombinanten Vektorkonstrukte wurden in kompetente JM83-Zellen transformiert und auf ampicillin- und XGal-haltige Agarplatten ausplattiert. Rekombinierte Klone lassen sich, aufgrund der Insertionsinaktivierung der β-Galactosidase, schnell als weiße Kolonien identifizieren, wohingegen Wildtypklone sich durch ihre Blaufärbung erkennen lassen. Von jedem Klonierungsansatz wurden 5 weiße Kolonien gepickt und aus Minikulturen im Schnellaufschlußverfahren die Plasmid-DNA in bereits sequenzierbarer Güte isoliert. Die Überprüfung der Insertion geschah durch Doppelverdauung eines Aliquots der isolierten DNA mit *Eco*RI/*Hind*III

und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte in Gegenwart eines geeigneten DNA-Längenstandards. Die Kombination dieser beiden Enzyme mußte gewählt werden, weil die insertierten Fragmente durch singuläre Schnitte mit *AccI*, *BamHI* bzw. *SmaI* nicht herauschneidbar sind, *EcoRI* und *HindIII* aber an drei Klonierungsstellen im Polylinker links bzw. rechts benachbart sind. Die Klone mit korrekter Insertion wurden für die Sequenzanalyse herangezogen. Im einzelnen waren das die:

RsaI-Fragmente 1-4: 760, 550, 500 und 240 bp,

TaqI-Fragmente 1-6: 530, 500, 350, 300, 270 und 130 bp,

HaeIII-Fragmente 1-6: 500, 400, 350, 280, 240 und 170 bp,

Sau3AI-Fragmente 1 und 2: 1370 und 475 bp,

MspI-Fragmente 1-8: 650, 350, 280, 180, 150, 120, 100, 80 bp),

vgl. dazu Tab. 15 und Fig. 15.

4.5.3. BESTIMMUNG DER NUKLEOTIDSEQUENZ DURCH PLASMIDSEQUENZIERUNG

Die Technik der Plasmidsequenzierung besitzt deutliche Vorteile gegenüber der M13-Einzelstrangsequenzierung. So kann man rekombinierte Plasmidkonstrukte ohne vorherige Subklonierung in einen M13-Phagenvektor, direkt sequenzieren. Die Qualität von Schnellaufschlüssen kleiner Übernachtskulturen ist ausreichend für gute Sequenzierungsergebnisse. Die Unwägbarkeiten möglicher Instabilitäten der Insertionen, mit denen man sich bei der Verwendung von M13-Vektoren oft konfrontiert sieht (vgl. 4.5.1.), können durch den Einsatz von Plasmidvektoren weitgehend ausgeschlossen werden. Die Technik der Plasmidsequenzierung basiert, ebenso wie die M13-Sequenzierung, auf dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977). Die zunächst als Doppelstrang vorliegende Plasmid DNA kann durch zweierlei Denaturierungsmethoden in eine einzelsträngige

Form, in der sie einer Sequenzanalyse zugänglich ist, überführt werden. Die erste Methode beruht auf der Hitze-Denaturierung des vorher linearisierten Plasmids (Smith *et al.*, 1979; Wallace *et al.*, 1981), die zweite auf der alkalischen Denaturierung der superhelikalen Form bei $\text{pH} > 12$ (Chen and Seeburg, 1985). Zweitere Methode ist bequemer in der Durchführung und liefert zudem auch bessere Resultate. Diese wurde auch in vorliegenden Sequenzierungsexperimenten, gemäß der Beschreibung in Kap. 3.7, eingesetzt. Die Auftrennung der sequenzierten Proben erfolgte über keilförmige Sequenzgele (siehe 3.7.3.), welche den gleichen Effekt haben wie die von Puffergradientengelen (Biggin *et al.*, 1983): die Laufgeschwindigkeit der Fragmente verhält sich aufgrund der zunehmenden Geldicke und der damit innerhalb des Gels abnehmenden Feldstärke annähernd proportional zum Molekulargewicht. Das bedeutet, daß im unteren Gelbereich der Abstand der Banden sich verringert und im oberen sich vergrößert. Man erhält also über einen weiten Bereich einen relativ gleichförmigen Bandenabstand, der das Lesen weit längerer Sequenzen erlaubt als es bei herkömmlichen Gelen der Fall ist. Bei herkömmlichen Gelen muß die Probe mehrfach zeitlich versetzt aufgetragen werden, um dieselbe Sequenzinformation wie bei der Verwendung von Keilgelen zu erhalten. Besonders effektiv ist die Technik des Keilgels in Verbindung mit der [^{35}S]-Markierung, da dessen weiche β -Strahlen die Banden auf dem Röntgenfilm wesentlich schärfer erscheinen lassen als es bei einer Markierung mit dem harten β -Strahler [^{32}P] der Fall ist. Auch in vorliegenden Sequenzierungsexperimenten wurde mit [^{35}S] gearbeitet.

Es wurde die vollständige Nukleotidsequenz des *Bam*HI-Fragments ermittelt und die Länge zu 2145 bp bestimmt (Fig. 21). In Fig. 18 ist eine Übersicht der angewandten Sequenzierungsstrategie zusam-

mengestellt. Die erhaltenen Sequenzdaten jedes einzelnen Klons wurden über ein Computer-Programm (Beckman: Microgenie) auf mögliche Homologien zur Vektor-DNA (pUC12) überprüft. Die Auswertung der Sequenzdaten aller positiven Klone wurde mit demselben Computerprogramm durchgeführt und zeigte, daß Überlappungen der Klone über den gesamten DNA-Bereich gegeben waren und daß beide Stränge vollständig sequenziert wurden (Fig. 18 und 20). Jede einzelne Base ist 3-7fach von der Sequenzanalyse erfaßt worden. Eine Auswahl von Sequenzgelen findet sich in Fig. 19.

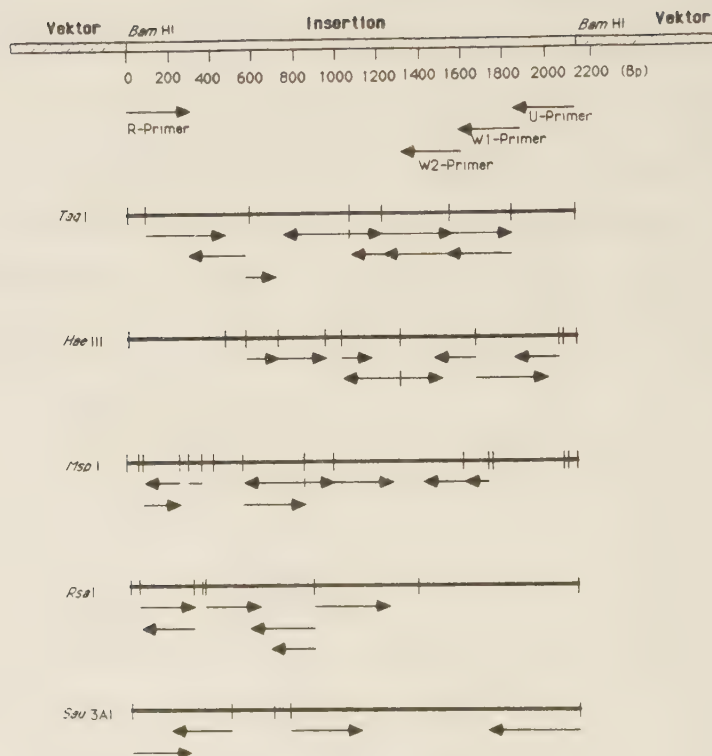


Fig. 18: Sequenzierungsstrategie und Überblick der sequenzierten Subklone

Zur Gewinnung der Subklone wurde das *Bam*HI-Fragment von Klon 3d^{ri}f mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*Hae*III, *Msp*I, *Taq*I, *Rsa*I, *Sau*3AI) geschnitten und die einzelnen Fragmente in kompatible Stellen von pUC12 kloniert. Die Restriktionskarte der verwendeten Enzymen entstammt der Nukleotidsequenz. Die Pfeile geben Umfang und Ausgangspunkt jeder Sequenzanalyse an. Die Nukleotidsequenz der Subklone wurde mit dem Universal- (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') bzw. Reversen Primer (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') nach dem Verfahren der Plasmidsequenzierung bestimmt. Sequenzierungen am gesamten *Bam*HI-Fragment wurden zusätzlich mit dem Universal- und Reverse-Primer bzw. auch mit den sequenzhomologen Primern W1 und W2 (vgl. 4.5.1) durchgeführt.

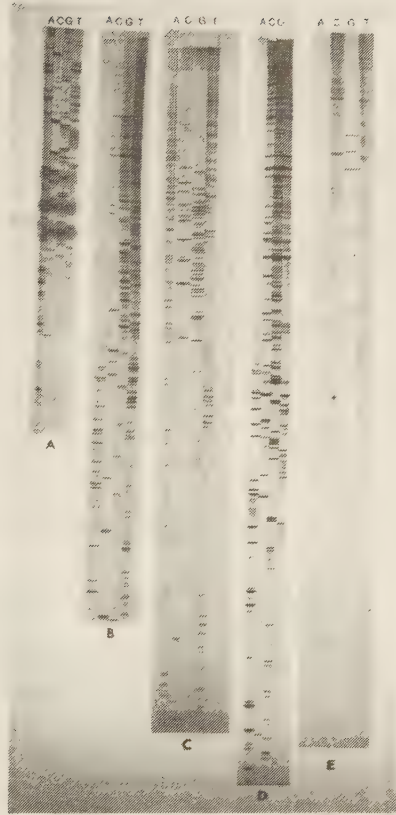
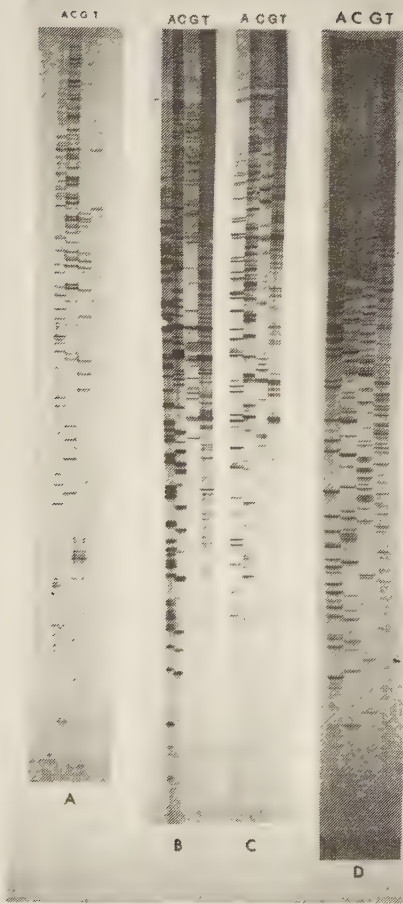


Fig. 19: Durch Plasmidsequenzierung ermittelte Nukleotidabfolge (links) aus Bereichen des Rifampicin-Resistentgens $3d^{rif}$

Die Auftrennung der Proben erfolgte in allen Fällen über ein 5%iges, keilförmiges Sequenzgel

- A: *Hae*III-Fragment: Base 850-1132
- B: *Taq*I-Fragment: Base 928-1063 (Gegenstrang)
- C: *Taq*I-Fragment: Base 1063-1350
- D: *Msp*I-Fragment: Base 1300-1585

Fig. 20: Nukleotidabfolge der am Gesamtklon $3d^{rif}$ mit diversen (rechts) Primern durchgeführten Sequenzreaktionen

- A: Universalprimer (Basen 1-300)
- B: Universalprimer (Basen 1-300)
- C: Reverse-Primer (Basen 2145-1845)
- D: W-1-Primer (Basen 260-560)
- E: W-1-Primer (Basen 260-560)

32
 GG ATC CAC AGG CTG CGA AGT AAT CAA TTC GTC
 62
 TGA AAG CTT GAG TAA CAA CGG AAA CCG GCC
 ----->
 92
 ATT GCG CCG GTT TTT TTT GGC CTG AGT TCT

 122
 TAA TTA TCT TCG CGA ATT ATT TGC CCG AAA
 152
 TGT GAA GAG GGT CAT AAC CAC AGG TCA AGG
 182
 AGA AAC AAT TTA TAA GGT CAA AGA AAT ACT
 212
 ATT GCT CAG GTC TAT ACC GTA TAC TCC TTT
 -35 (P1) -10 (P1)
 242
 CAG CCA CAA AAA AAG TCA TGT TGG TTT CGC
 272
 AAG TTA CCC AGA GCA TGG AAG CAG GTT AAG
 302
 GCT TGC GGA GTG TCT GGC TGA CAG ATA ATC
 -35 (P2) -10 (P2)
 332
 GTC GAT GAG GGC AGT TTT ATG GAA AAG AAA
 . . SD Met Glu Lys Lys
 362
 CAC ATT TAT CTG TTT TGT TCT GCG GGC ATG
 His Ile Tyr Leu Phe Cys Ser Ala Gly Met
 392
 TCT ACC TCT TTA CTG GTA TCA AAA ATG CGC
 Ser Thr Ser Leu Leu Val Ser Lys Met Arg
 422
 GCA CAG GCA GAA AAA TAT GAA GTT CCG GTC
 Ala Gln Ala Glu Lys Tyr Glu Val Pro Val
 452
 ATT ATT GAA GCA TTT CCG GAA ACA CTG GCT
 Ile Ile Glu Ala Phe Pro Glu Thr Leu Ala
 482
 GGT GAA AAA GGT CAG AAT GCC GAT GTC GTG
 Gly Glu Lys Gly Gln Asn Ala Asp Val Val

512
TTA TTA GGG CCG CAG ATT GCT TAT ATG TTG
Leu Leu Gly Pro Gln Ile Ala Tyr Met Leu

542
CCC GAA ATC CAG CGT TTG TTA CCC AAC AAA
Pro Glu Ile Gln Arg Leu Leu Pro Asn Lys

572
CCG GTT GAA GTA ATT GAC TCG CTG CTT TAT
Pro Val Glu Val Ile Asp Ser Leu Leu Tyr

602
GGC AAA GTC GAT GGT TTA GGC GTG CTT AAG
Gly Lys Val Asp Gly Leu Gly Val Leu Lys

632
GCT GCG GTT GCA GCG ATT AAA AAA GCC GCA
Ala Ala Val Ala Ala Ile Lys Lys Ala Ala

662
GCA AAT TAA TTT ATT TTA AAT TTT CCC GTC
Ala Asn End

692
AAA GAG TTA TTT CAT AAA TCA ATA CCG CAA

722
TAT TTA AAT TGC GGT TTT TAA GGG TAT TTT
SD

752
B
TCT ATG AGT AAT GTT ATT GCA TCG CTT GAA
Met Ser Asn Val Ile Ala Ser Leu Glu

782
AAG GTA CTC CTC CCT TTT GCA GTT AAA ATA
Lys Val Leu Leu Pro Phe Ala Val Lys Ile

812
GGA AAG CAG CCA CAC GTT AAT GCA ATC AAA
Gly Lys Gln Pro His Val Asn Ala Ile Lys

842
AAT GGC TTT ATT CGC TTA ATG CCG TTT AAC
Asn Gly Phe Ile Arg Leu Met Pro Phe Asn

872
CTT GCG GGG GCC ATG TTT GTA TTA ATT AAC
Leu Ala Gly Ala Met Phe Val Leu Ile Asn

902
AAC GTT TTT CTA AGC TTT GGG GAG GGG TCG
Asn Val Phe Leu Ser Phe Gly Glu Gly Ser

932
TTT TTT TAT TCC TTA GGT ATT CGC CTC GAC
Phe Phe Tyr Ser Leu Gly Ile Arg Leu Asp

962
GCC TCA ACC ATT GAA ACA CTT AAT GGT CTG
Ala Ser Thr Ile Glu Thr Leu Asn Gly Leu

992
AAA GGT ATT GGC GGC AAC GTA TAT AAC GGA
Lys Gly Ile Gly Gly Asn Val Tyr Asn Gly

1022
ACA TTA GGA ATA ATG TCT TTA ATG GCA CCG
Thr Leu Gly Ile Met Ser Leu Met Ala Pro

1052
TTC TTT ATT GGC ATG GCG CTG GCA GAA GAG
Phe Phe Ile Gly Met Ala Leu Ala Glu Glu

1082
CGT AAA GTC GAT GCG CTG GCG GCT GGG TTG
Arg Lys Val Asp Ala Leu Ala Ala Gly Leu

1112
TTA TCC GTT GCA GCA TTT ATG ACC GTC ACC
Leu Ser Val Ala Ala Phe Met Thr Val Thr

1142
CCA TAT AGT GTC GGT GAG GCC TAT GCG GTT
Pro Tyr Ser Val Gly Glu Ala Tyr Ala Val

1172
GGT GCA AAC TGG TTA GGT GGG GCG AAT ATC
Gly Ala Asn Trp Leu Gly Gly Ala Asn Ile

1202
ATC TCC GGG ATT ATT ATT GGC CTG GTG GTG
Ile Ser Gly Ile Ile Ile Gly Leu Val Val

1232
GCA GAA ATG TTT ACC TTT ATT GTC CGC CGC
Ala Glu Met Phe Thr Phe Ile Val Arg Arg

1262
AAT TGG GTC ATT AAA CTG CCC GAC AGC GTA
Asn Trp Val Ile Lys Leu Pro Asp Ser Val

1292
CCT GCT TCA GTA TCG CGT TCC TTC TCG GCA
Pro Ala Ser Val Ser Arg Ser Phe Ser Ala

1322
TTA ATT CCC GGC TTT ATT ATT CTT TCC GTG
Leu Ile Pro Gly Phe Ile Ile Leu Ser Val

1352
ATG GGG ATT ATT GCC TGG GCG TTG AAT ACC
Met Gly Ile Ile Ala Trp Ala Leu Asn Thr

1382
TGG GGC ACC AAC TTC CAT CAG ATC ATT ATG
Trp Gly Thr Asn Phe His Gln Ile Ile Met

1412
GAT ACC ATC TCA ACC CCA CTG GCA TCG TTG
Asp Thr Ile Ser Thr Pro Leu Ala Ser Leu

1442
GGT AGC GTG GTG GGC TGG GCC TAT GTG ATC
Gly Ser Val Val Gly Trp Ala Tyr Val Ile

1472
TTT GTT CCA CTG CTC TGG TTC TTC GGT ATT
Phe Val Pro Leu Leu Trp Phe Phe Gly Ile

1502
CAT GGC GCG CTG GCG CTG ACC GCA CTG GAC
His Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Leu Asp

1532
AAC GGC ATT ATG ACG CCG TGG GCA CTG GAA
Asn Gly Ile Met Thr Pro Trp Ala Leu Glu

1562
AAT ATC GCG ACC TAT CAG CAA TAT GGT TCC
Asn Ile Ala Thr Tyr Gln Gln Tyr Gly Ser

1592
GTC GAA GCG GCG CTG GCA GCC GGT AAG ACC
Val Glu Ala Ala Leu Ala Ala Gly Lys Thr

1622
TTC CAT ATC TGG GCC AAG CCG ATG CTG GAC
Phe His Ile Trp Ala Lys Pro Met Leu Asp

1652
TCC TTT ATT TTC CTT GGG GAA AAT GGT GCG
Ser Phe Ile Phe Leu Gly Glu Asn Gly Ala

1682
ACT TTA GGC CTG ATC CTG GCT ATC TTT ATC
Thr Leu Gly Leu Ile Leu Ala Ile Phe Ile

1712
GCC TCT CGC CGT GCT GAT TAT CGT CAG GTG
Ala Ser Arg Arg Ala Asp Tyr Arg Gln Val

1742
GCA AAA CTG GCG CTG CCG TCC GGC ATC TTC
Ala Lys Leu Ala Leu Pro Ser Gly Ile Phe

1772
CAG ATT AAC GAA CCG ATT CTG TTT GGT CTG
Gln Ile Asn Glu Pro Ile Leu Phe Gly Leu

1802

CCA ATT ATC ATG AAC CCG GTG ATG TTT ATC
Pro Ile Ile Met Asn Pro Val Met Phe Ile

1832

CCG TTT GTA CTG GTA CAA CCG ATT CTG GCG
Pro Phe Val Leu Val Gln Pro Ile Leu Ala

1862

GCA ATC ACC CTC GCA GCG TAC TAC ATG GGC
Ala Ile Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Met Gly

1892

ATT ATT CCT CCG GTG ACC AAT ATT GCA CCG
Ile Ile Pro Pro Val Thr Asn Ile Ala Pro

1922

TGG ACC ATG CCA ACC GGT CTG GGA GCC TTC
Trp Thr Met Pro Thr Gly Leu Gly Ala Phe

1952

TTT AAC ACC AAC GGT AGC GTC GCC GCA TTG
Phe Asn Thr Asn Gly Ser Val Ala Ala Leu

1982

CTG GTC GCA CTC TTC AAC CTT GGC ATC GCA
Leu Val Ala Leu Phe Asn Leu Gly Ile Ala

2012

ACG TTA ATT TAT CTG CCC TTT GTT GTG GTG
Thr Leu Ile Tyr Leu Pro Phe Val Val Val

2042

GCT AAC AAA GCA CAA AAT GCG ATT GAT AAA
Ala Asn Lys Ala Gln Asn Ala Ile Asp Lys

2072

GAA GAG AGC GAA GAA GAT ATC GCT AAC GCC
Glu Glu Ser Glu Glu Asp Ile Ala Asn Ala

2102

CTG AAA TTT TAA TCG ATG CCG GTA CGG GTA
Leu Lys Phe End

2132

ATC GTG CCG GTA AGA AAA GAG AGG AAC GAT

2145

GTA TGA TGG ATC C

Fig. 21: Nukleotidsequenz des Rifampicin-Resistenzgens 3d^{rif} und die entsprechenden Aminosäuren der Genprodukte

Die Bezifferung der Basensequenz beginnt mit der Nummer 1 im 5'-nicht-translatiertem Bereich. Die den beiden offenen Leserahmen A (321-638) und B (726-2081) entsprechenden Aminosäuresequenzen sind im Drei-Buchstaben-Code geschrieben. Die -10 und -35 Regionen der zwei möglichen Promotoren P1 und P2 sind durch horizontale Linien gekennzeichnet. Die Initiationsstellen der Transkription (vgl. Text) sind durch Punkte unterhalb der jeweiligen Base markiert (Pos. 214, 307, 310). Zwei umgekehrte Repetitionen, die möglicherweise an der Transkriptionstermination beteiligt sind, finden sich an den Positionen 53-76 und 686-707 und sind durch horizontale Pfeile gekennzeichnet. Weitere, innerhalb der Sequenz vorkommende, umgekehrte Repetitionen sind ebenfalls durch horizontale Pfeile angezeigt. Die beiden ribosomalen Bindungsstellen (Pos. 310 und 712) sind unterstrichen und durch das Kürzel SD markiert.

4.5.4. Analyse des sequenzierten Rifampicin-Resistenzgens 3d^{rif}

Die Analyse der ermittelten Sequenz mit Hilfe des Microgenie-Computerprogramms bestätigte die in Fig. 14 vorgeschlagene Restriktionskarte des *Bam*HI-Fragments mit unwesentlichen Abweichungen. Eine Übersicht aller wesentlichen Schnittstellen findet sich in Tab. 21 (im Anhang).

Die in Fig. 21 gezeigte Sequenz enthält zwei offene Leserahmen (bezeichnet als A bzw. B), die sich von Position 321-638 bzw. 726-2081 erstrecken. Der 106 Codons umfassende offene Leserahmen A beginnt mit ATG (Met) und endet mit AAT (Asn), das Molekulargewicht des kodierten Polypeptids beträgt 11424 Dalton. Der offene Leserahmen B beginnt ebenfalls mit ATG, endet aber mit TTT (Phe). Das Molekulargewicht des entsprechenden, aus 452 Codons bestehenden Polypeptids ist zu 48486 Dalton bestimmt worden. Beide Leserahmen liegen auf dem gleichen DNA-Strang und sind durch einen 86 bp langen Spacer (Pos. 639-725) getrennt. Weitere Leserahmen mit

einer Länge größer als 200 bp konnten auf beiden Strängen nicht mehr gefunden werden.

Auf der Basis der Homologie zu Consensus-Sequenzen der -10 und -35 Regionen von *E.coli*-Promotoren (Pribnow, 1975; Rosenberg and Court, 1979; Hawley and McClure, 1983) lassen sich in der vom Leserahmen A 5'stromaufwärts gelegenen Region zwei mögliche Promotoren ausmachen (P1 und P2 in Fig. 21 und in Tab. 16). Die -10 Region von P1 (TATACT) zeigt in 5 von 6 Positionen Übereinstimmung mit der Consensus-Sequenz (TATAAT), ebenso findet sich das für die -35 Region charakteristische, stark konservierte Trinukleotid TTG. Der ungewöhnlich kleine Abstand von 13 bp zwischen der -10 und -35 Region deutet auf einen schwachen Promotor hin, denn der optimale Abstand für *E.coli*-Promotoren beträgt 17 bp (Hawley and McClure, 1983). Die exakte Startstelle der Transkription kann zwar nicht nach festen Regeln vorausgesagt werden (Aiba *et al.* 1983, Bertrand *et al.*, 1983), liegt aber im Mittel 5-8 Basen stromabwärts von der -10 Region und beginnt in den meisten Fällen mit A (Rosenberg *et al.*, 1979), so daß als Transkriptionsstart von P1 das 6 Basen von der -10 Region entfernte Nukleotid A auf Position 214 diskutiert werden muß. Promotor 2 (P2) stimmt hinsichtlich der -10 Region (GATAAT) ebenfalls in 5 Positionen mit der Consensus-Sequenz überein. Im Abstand von 15 bp befindet sich die -35 Region mit dem charakteristischen Trinukleotid TTG. Als Startposition der Transkription bieten sich das 5 oder das 8 Basen entfernte Nukleotid A (Pos. 307 bzw. 310) an. Obgleich Promotor 2 den Consensus-Sequenzen ähnlicher ist als Promotor 1, kann nicht gesagt werden, ob beide oder nur einer und welcher *in vivo* benutzt werden. Eine verbindliche Aussage darüber kann erst durch Bestimmung des 5'-Endes

der RNA und S1 Nuklease-Kartierung der fraglichen Region gemacht werden.

Dem Initiationscodon (ATG) des Leserahmens A geht in einem Abstand von 8 Basen eine Sequenz 5'-AGG-3' voraus, welche komplementär ist zu der Sequenz 3'-UCC-5' der 16S rRNA (Shine and Dalgarno, 1974). Scherer *et al.* (1980) und Stormo *et al.* (1982) konnten zeigen, daß für eine effiziente Translation nicht nur eine optimale Primärstruktur für die Interaktion mit der 16S rRNA gegeben sein muß, sondern daß die Sekundärstruktur der mRNA in der Umgebung des Startbereiches ein freiliegendes Startcodon garantieren soll. Demzufolge ist die Zusammensetzung der Nukleotide innerhalb des Bereiches -20 bis +15, relativ zum Initiationscodon nicht zufälliger Natur, sondern es lassen sich in der Auswahl der Nukleotide gewisse Regeln ableiten: Position -3 sollte C oder A sein, Pos. -4 sollte A, Pos. -5 sollte A oder T sein, zwischen Pos. -1 und -7 sollten weniger als 2 G vorkommen. Pos. +5 sollte C oder A, Pos. 10 A oder T und Pos. 12 sollte A oder T sein. Die Sequenz in der Umgebung des Initiationscodons von Leserahmen A erfüllt diese aufgestellten Regeln ausnahmslos, so daß hier eine vollständige ribosomale Bindungsstelle (RBS) vorliegen sollte.

In der stromaufwärts gelegenen 5'-Region des zweiten offenen Leserahmens lassen sich keine Sequenzen finden, welche eine zwingende Promotorstruktur erlauben. Andererseits jedoch können Promotorsequenzen äußerst variabel gestaltet sein (Rosenberg and Court, 1979), so daß ohne zusätzliche Information mit der Möglichkeit gerechnet werden muß, daß diese Region einen Promotor enthält. Vor dem Initiationscodon (ATG) des Leserahmens B liegt 10 Basen stromaufwärts eine Shine-Dalgarno-Sequenz (5'-AAGG-3'). Die Nukleo-

tidverteilung in der Nachbarschaft des Initiationscodons zeigt zu 75% Übereinstimmung mit den oben besprochenen Regeln.

Im nicht-translatierten, 86 bp umfassenden Bereich zwischen Gen A und B findet sich eine 8 bp lange, GC-reiche umgekehrte Repetition (beginnend an Pos. 686), unmittelbar gefolgt von 4 T (Fig. 22), welche als rho-unabhängiges Terminationssignal fungieren könnte (Brendel and Trifonov, 1984). Diese Sequenz entspricht einer sehr stabilen Haarnadelstruktur in der mRNA, mit einem nach Tinoco *et al.* (1973) berechnetem ΔG -Wert von -71 kJ/mol. Eine zweite potentielle Haarnadelstruktur von jedoch unerheblicher Stabilität (-11.5 kJ/mol) findet sich 5' (beginnend an Pos. 640) zur größeren umgekehrten Repetition.



5'-TTCATAAAATCAA TTTAAGGGTATT-3'

Fig. 22: Struktur des Terminators

Diese Abbildung zeigt die Struktur des Terminators in der 3' zu Leserahmen A liegenden nicht kodierenden Region (Pos. 673-720 in Fig. 21).

Im 3'-stromabwärts von Leserahmen B gelegenen Bereich sind keine Terminationssignale der Transkription erkennbar. Da jedoch das Stopcodon des Leserahmens B nur 60 Basen vom Ende des klonierten Fragments entfernt ist, muß man wohl annehmen, daß ein Terminationssignal in dem nicht mehr verfügbaren 3'-DNA-Bereich folgt. Die Diskussion der Termination wirft überhaupt die Frage nach den Transkriptionseinheiten auf, ob nun beide Leserahmen als eine Transkriptionseinheit unter Kontrolle der Promotoren 1 oder 2 in

Form einer polycistronischen mRNA oder als zwei getrennte mRNAs abgelesen werden. Die Existenz der zwischen den beiden Leserahmen gelegenen terminatorähnlichen Sequenz kompliziert die Beantwortung dieser Frage, da die Funktion dieser Struktur zu klären bleibt. Es besteht nun die Möglichkeit, daß Leserahmen B als Teil einer Transkriptionseinheit exprimiert wird und sein Transkript durch ein "Überlaufen" des Terminators zustande kommt. In diesem Falle würde man für die Expression des zweiten Leserahmens eine weit schwächeres Transkript als für den Leserahmen A erwarten.

Interessanterweise grenzt diese umgekehrte Terminationsstruktur unmittelbar an die DNA-Sequenz, welche der potentiellen Ribosomen-Bindungsstelle von Leserahmen B entspricht. Die Gegenwart dieser komplementären umgekehrten Repetition kann eine stabile Haarnadelstruktur in der mRNA des Leserahmens A bedingen, welche den Ribosomen den Zugang zur potentiellen Bindungsstelle erschweren könnte. Diese Art der Regulation auf Translationsebene findet sich z.B. auch bei einigen Chloramphenicol-Resistenzgenen (Williams *et al.*, 1981; Harwood *et al.*, 1983; Brenner and Shaw, 1985). Ob nun in Gegenwart von Rifampicin auf irgendeine Weise diese Struktur destabilisiert wird und dadurch eine verstärkte Translation auch des Leserahmens B stattfindet, bleibt zu klären.

Eine weitere, terminatorähnliche Sequenz (-GCreiche Nukleotidabfolge, gefolgt von mehreren T) findet sich in der 5'nichttranslatierten Region, stromaufwärts von Leserahmen A, die sich von Position 53 bis 76 erstreckt. Auch diese Sequenz entspricht einer stabilen Haarnadelstruktur in der mRNA (Fig. 23) mit einem ΔG Wert von -78.6 kJ/mol (berechnet nach Tinoco *et al.*, 1973).



Fig. 23: Terminatorstruktur

Die gezeigte Sequenz erstreckt sich von Pos. 41 bis 88, entsprechend der Numerierung in der unter Fig. 21 gezeigten Sequenz.

Die dargestellte Struktur zeigt alle Merkmale eines rho unabhängigen Terminationssignals, hat aber offenbar, da es am 5'Ende der Sequenz lokalisiert ist, nichts mit der Transkriptions- bzw. Translationskontrolle der Leserahmen A und B zu tun. Vielmehr könnte es als Terminationssignal eines anderen, nicht mehr auf diesem DNA-Abschnitt befindlichen Gens, dienen. Die Existenz dieses Terminators liefert einen Hinweis dafür, daß Leserahmen A und B nicht Bestandteile eines nach 5'stromaufwärts sich erstreckenden Operons sind. Die Organisation der beiden Leserahmen als Operonstruktur kann aber, da am 3'Ende des Leserahmens B kein Terminator auszumachen ist, für die 3'stromabwärts gelegene Sequenz nicht ausgeschlossen werden.

Daß es sich bei den beiden offenen Leserahmen auch wirklich um Gene handelt, muß aufgrund der Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* durchgeführten Genexpressionsstudien (Kollenda. 1985; Skrobranek, pers. Mitt.) angenommen werden. Jedoch können die dabei gefundenen Proteinbanden noch nicht exakt den theoretisch berechneten Molekulargewichten zugeordnet werden.

Die Lage des am 5'Ende des *Bam*HI-Fragments gelegenen Terminators erklärt auch im nachhinein die negativen Ergebnisse der früheren Studien mit Expressionsvektoren. In diesen Experimenten wurde das *Bam*HI-Fragment durch geeignete Klonierung in den Vektor pJF 118u (Lanka, nicht publiziert) unter die Kontrolle des *tag*-Promotor gestellt und in den Wirt *E.coli* HB101 transformiert. Die transformierten Zellen zeigten in der *log*-Phase nur schwache Expression, die auch durch Induktion der Transkription mittels IPTG nicht verstärkt werden konnte. Diese Befunde lassen sich womöglich durch die Termination eines vom *tag*-Promotor ausgehenden Transkripts an dieser haarnadelartigen Struktur, die 240 bp stromaufwärts vom Translationsstart des Leserahmens A liegt (Fig. 21), erklären.

- Aminosäurezusammensetzung

Die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäurezusammensetzung der von Leserahmen A und B kodierten Proteine ist in Tab. 17 zusammengefaßt. Zu Vergleichszwecken ist auch der Aminosäureaufbau eines "Durchschnittsproteins" aufgeführt, das auf der Analyse von 314 sequenzierten Proteinen basiert (Dayhoff *et al.*, 1978). Ein Vergleich der Leserahmen A und B mit anderen Proteinen läßt einige Besonderheiten erkennen:

1) Protein, kodiert von Leserahmen A:

Im Vergleich zum "Durchschnittsprotein" (20.2%) ist ein relativ hoher Gehalt an hydrophoben Aminosäuren (37%) festzustellen. Der Anteil an geladenen Resten (22.6%) entspricht annähernd dem des "Durchschnittsproteins" (25.1%).

Offene Leserahmen	Position von bis	Anzahl der Codons	Molekulargewicht
Leserahmen A	321 638	106	11424
Leserahmen B	726 2081	452	48486

Promotorstrukturen	Sequenz
"Consensus"-Sequenz	-35 -10 +1 TTGaca-ttt-(6-9bp)-atttttgtTATAATg-(4-7bp)-cat
Promotor 1 (184-217)	TTGCTC (AGGTCTATACCG) TATACT CCTTTCAGCC
Promotor 2 (275-311)	TTGCGG AGTGTCTGGCTGACA GATAAT CGTCGATGAG

Ribosomale Bindungsstelle	Sequenz
Pos. 306-323	GATGAGGGCAGTTTTATG
Pos. 707-728	TTTTAAGGGTATTTTTCTATG

Terminatorstruktur	Sequenz
Pos. 41-88	AAACCGGCATTGCGCCGCTTTTTTTTT
Pos. 686-707	ACCGCAATATTTAAATTGCGGTTTTT

Tab. 16: Übersicht der besonderen Strukturmerkmale der Nukleotidsequenz des Rifampicin-Resistenzgens 3d^{rif}

Zur Sequenz des *E. coli* "Consensus"-Promotors vgl. Winnacker (1984)

Tab. 17: Aminosäurezusammensetzung von Leserahmen A und B
im Vergleich zu anderen Proteinen

Amino- säure	Aminosäuren-Zusammensetzung				
	Leserahmen A		Leserahmen B		Durchschnitts- protein
	Reste	%	Reste	%	%
Ala A	14	13.1	56	12.4	8.6
Asx B (D+N)	6	(5.6)	35	(7.7)	(9.8)
Cys C	1	0.9	0	0	2.9
Asp D	3	2.8	9	2.0	5.5
Glu E	8	7.5	15	3.3	6.0
Phe F	2	1.9	32	7.1	3.6
Gly G	7	6.5	40	8.8	8.4
His H	1	0.9	4	0.9	2.0
Ile I	7	6.5	49	10.8	4.5
Lys K	10	9.3	13	2.9	6.6
Leu L	13	12.1	52	11.5	7.4
Met M	4	3.7	16	3.5	1.7
Asn N	3	2.8	26	5.7	4.3
Pro P	6	5.6	23	5.1	5.2
Gln Q	4	3.7	8	1.8	3.9
Arg R	2	1.9	9	2.0	4.9
Ser S	5	4.7	25	5.5	7.0
Thr T	2	1.9	21	4.6	6.1
Val V	10	9.3	34	7.5	6.6
Trp W	0	0	9	2.0	1.3
Tyr Y	4	3.7	11	2.4	3.4
Glx Z (E+Q)	12	11.2	23	(5.1)	(9.9)
Saure (Asp+Glu)	11	10.3	24	5.3	11.6
Basische (Arg+Lys+His)	13	12.3	26	5.8	13.5
Hydrophobe (Leu+Val+ Ile+Met)	34	32.0	151	33.4	20.2
Aromatische (Phe+Tyr+Trp)	6	5.6	52	11.5	8.3
Geladene (Asp+Glu+Lys+ Arg+His)	24	22.6	50	11.0	25.1
Reste	106		452		
Molekularge- wicht	11428		48486		

2) Protein, kodiert von Leserahmen B:

Auch hier ist ein hoher Anteil an hydrophoben Aminosäuren (45%) im Vergleich zum "Durchschnittsprotein" zu verzeichnen. Der Gehalt an geladenen Resten (11.0%) ist, verglichen mit dem des "Durchschnittsproteins" (25.1%), sehr niedrig. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß beide Leserahmen für Proteine kodieren, deren auffallend starke Hydrophobizität denen von Membranproteinen nahekommt (Oliver, 1985; Nikaido and Vaara, 1985).

- Codonauswahl

Die Verwendung synonymer Codons erfolgt nicht rein statistisch (Ikemura and Ozeki, 1982), denn ein Vergleich der Codonverwendung in stark und schwach exprimierten Genen läßt einige Regeln der Codonauswahl erkennen (Ikemura and Ozeki, 1982; Grosjean and Fiers, 1982). In Tab. 18 sind die in den Leserahmen A und B vorliegenden Codons mit der Codonauswahl von schwach und stark exprimierten Genen dargestellt. Grosjean und Fiers (1982) stellten fest, daß hoch exprimierte Gene keine Codons enthalten, die den Anticodons der nur in geringen Mengen vorkommenden tRNA-Species entsprechen. Diese, als Modulator-Codons bezeichneten Codons findet man in Genen von Proteinen, die nur in wenigen Kopien pro Zelle vorkommen und eine steuernde (modulierende) Rolle in der Translation ausüben, w.z.B. Repressoren (Königsberg and Godson, 1983). Die Codonauswahl im Leserahmen B ist typisch für ein schwach exprimiertes Protein. Die Codons, welche in hoch exprimierten *E. coli*-Proteinen am häufigsten vorkommen, w.z.B. Valin GTT, Serin TCT, Threonin ACT, Alanin GCT und Glycin GGT, sind in Leserahmen B deutlich unterrepräsentiert (Tab. 18). Anstelle dessen findet man

seltene Codons (vgl. Legende zu Tab. 18) in größerer Anzahl: am auffälligsten sind Phe TTT, Ser TCG und Ala GCC. Die seltenen Codons werden in der Größenordnung von 30% (136 von 451) benutzt. Leserahmen B enthält auch auffallend viele Modulatorcodons, gekennzeichnet durch schwarze Punkte in Tab. 18. Dies entspricht einer ähnlichen Situation, wie man sie auch in schwach exprimierten Regulatorgenen vorfindet (Koenigsberg and Godson, 1983). Die Codonauswahl der Leserahmen A und B gehen nicht konform. Leserahmen A zeigt zwar auch eine deutliche Tendenz zur Verwendung der für schwach exprimierte Proteine typischer Codons. Diese ist jedoch nicht so deutlich ausgeprägt wie bei Leserahmen B. So werden nur zu einem Anteil von 13% (14 von 109) seltene Codons benutzt (vgl. Legende zu Tab. 18) und auch die für schwach exprimierte Proteine typischen Modulatorcodons finden nicht in dem Ausmaß Berücksichtigung, wie es bei Leserahmen B der Fall ist.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die in beiden Leserahmen verzeichnete, deutlich reduzierte Benutzung von Anticodons in tRNA-Arten, die in großen Mengen verfügbar sind, einen Hinweis dafür liefert, daß beide Gene nicht stark exprimiert werden und daß zwischen beiden Genen wiederum Unterschiede in der Codonauswahl auffallen (Leserahmen A nimmt eine Mittelstellung zwischen schwach und stark exprimierten Genen ein, Leserahmen B entspricht schwach exprimierten Genen).

Tab. 18: Vergleich der Codonauswahl in stark und schwach exprimierten Genen mit der Codonzusammensetzung von Leserahmen A und B

Amino- säure	Codonauswahl [%] ^a				Amino- säure	Codonauswahl [%] ^a					
Codon	A	B	s ^b	S ^c	Codon	A	B	s ^b	S ^c		
Phe	TTT	100	72	60	23	Ala	GCT	21	11	17	50
	TTC	0	28	40	77		GCC	14	20	34	6
Leu	TTA	38	17	12	3		GCA	43	41	20	26
	TTG	15	8	11	4		GCG	21	28	29	18
	CTT	15	12	12	4	Tyr	TAT	100	82	60	17
	CTC	0	12	12	3		TAC	0	18	40	83
	CTA	0	2	4	0	His	CAT	0	75	62	32
	CTG	31	50	49	86		CAC	100	25	38	68
Ile	ATT	86	60	52	21	Gln	CAA	0	37	35	14
	ATC	24	35	39	79		CAG	100	63	65	86
	ATA	0	5	9	0	Asn	AAT	75	46	51	5
Val	GTT	30	21	31	44		AAC	25	54	49	95
	GTC	30	24	19	17	Lys	AAA	80	69	79	71
	GTA	20	21	14	31		AAG	20	31	21	29
	GTG	20	35	36	17	Asp	GAT	75	56	63	31
Ser	TCT	60	8	12	44		GAC	25	44	37	69
	TCC	0	32	16	31	Glu	GAA	100	27	68	75
	TCA	20	12	12	2		GAG	0	73	32	25
	TCG	20	20	21	0	Cys	TGT	100	0	47	20
	AGT	0	8	19	6		TGC	0	0	53	80
	AGC	0	20	20	17	Trp	TGG	0	100	100	100
Pro	CCT	0	13	13	6	Arg	CGT	50	44	29	72
	CCC	23	13	21	3		CGC	50	56	38	26
	CCA	0	26	20	18		CGA	0	0	8	0
	CCG	67	48	46	74		CGG	0	0	12	0
Thr	ACT	0	5	17	48		AGA	0	0	8	0
	ACC	50	76	44	41		AGC	0	0	5	0
	ACA	50	10	12	7	Gly	GGT	43	35	33	58
	ACG	0	10	28	3		GGC	57	32	38	40
					GGA		0	13	11	1	
					GGG		0	20	18	1	

zu Tab. 18

^a% Codonauswahl = Anzahl der verwendeten Codons/Gesamtzahl der Codons einer Aminosäure.

^{s^b}% Codonauswahl schwach exprimierter Gene, berechnet wie unter ^a. Hierbei wurde die Codonauswahl von 20 schwach exprimierten Genen, u.a. auch von Repressorproteinen, gemäß Grosjean and Fiers (1982) berücksichtigt. Codons mit regulatorischen Eigenschaften (Modulatorcodons), die typisch für Repressorproteine sind, sind mit Punkten gekennzeichnet.

^{s^c}% Codonauswahl hoch exprimierter Gene, berechnet wie unter ^a. Diese wurde für hoch exprimierte typische Proteine von Gouy und Gautier (1982) durch Analyse der Codons einer Vielzahl stark exprimierter Gene erstellt.

Seltene Codons sind: Leu: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA; Ile: AUA;
Ser: UCA, UCG, AGU; Pro: CCU, CCC; Thr: ACA;
Arg: CGC, AGA, AGG, CGA; Gly: GGA, GGG.

- Vorhersage der Sekundärstruktur

Um weitere Hinweise über Natur und evtl. Lokalisation dieser beiden Proteine zu erfahren, wurden die Aminosäuresequenzen der Leserahmen A und B einer Computeranalyse unterzogen. Das dabei verwendete Computerprogramm (vgl. Kap. 3.10.2.) vermag Sekundärstrukturen von Proteinen, den Grad der Hydrophobizität und potentielle antigene Epitope vorauszusagen (Chou and Fasman, 1974; Hopp and Words, 1981).

Die Analyse ergab für Leserahmen A 56% α -Helix, 40% β -Faltblatt und 5% "turns" (Fig. 25). Von den 106 Aminosäuren sind 21 geladen (11 saure und 10 basische Reste (vgl. Fig. 24). Die Ladungen sind gleichmäßig über das ganze Protein verteilt. Die durch die Chou-Fasman-Analyse ermittelte Sekundärstruktur deutet auf das Vorliegen eines integralen Membranproteins hin. Gestützt wird diese Annahme durch den stark hydrophoben Charakter und den großen Anteil

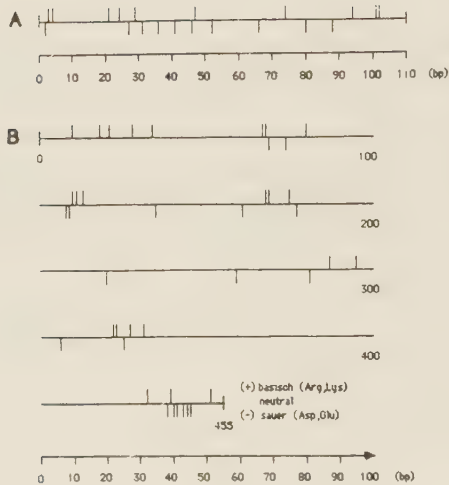


Fig. 24: Verteilung der geladenen Aminosäuren innerhalb der von Leserahmen A und B kodierten Proteine

Die Zahlen geben die Aminosäuren, beginnend vom NH₂-Ende, an. Basische Reste (Arg+Lys) sind durch nach oben und saure Reste (Asp+Glu) durch nach unten gerichtete Linien angezeigt.

A = Leserahmen A

B = Leserahmen B

α -helikaler Struktur (56%). Voraussetzung für ein integrale Membranproteine ist eine lange Sequenz an hydrophoben Aminosäuren α -helikaler Konformation, die von positiv geladenen Resten gefolgt sind (Capaldi *et al.*, 1983). Diese Bedingungen sind auch anzutreffen (Fig. 24, 25). Auszuschließen ist ein Protein, das die Membran mehrmals durchquert (ein sog. polytopisches Polypeptid), da hier andere Verhältnisse vorliegen müßten. Die bekanntesten Beispiele dafür wären das Bakteriorhodopsin (Khorana *et al.*, 1979) und die Lactose-Permease (Foster *et al.*, 1983; Sarkar *et al.*, 1986), welche beide die Membran in "zig-zag"-Art durchqueren.

Diskutiert man Membranproteine, so muß hier auch angemerkt werden, daß bei den meisten Membranproteinen das NH₂-Ende eine wichtige

Rolle bei der Bestimmung der Lokalisation innerhalb der Membran spielt. Diese sog. Signalsequenzen bestehen aus einem positiv geladenen NH₂-Ende, gefolgt von 10-15 hydrophoben Aminosäuren (v.Heijne, 1984). Dieses Signalpeptid wird nach Inkorporierung in die Membran abgespalten. Die Analyse der Hydrophobizität des von Leserahmen A kodierten Proteins (Fig. 25) deutet jedoch auf keine, für eine abtrennbare Signalpeptid charakteristische hydrophobe Region hin. Manche Hüllproteine z.B. zeigen an anderen Stellen innerhalb des Moleküls starke Hydrophobizität, von denen man annimmt, daß sie für die Verankerung des Proteins in der Membran verantwortlich sind. Ein Beispiel dafür ist das Gen III-Protein des Phagen *φ1*, welches eine carboxyterminale Ankersequenz enthält (Boeke and Model, 1982). Eine derart gestaltete Domäne läßt sich aber ebenfalls nicht in diesem Protein finden. Die Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* z.B., ein periplasmatisches Protein (Voor-douw and Brenner, 1985), besitzt ebenfalls keine Signalsequenz, so daß für die Translokation dieses Enzyms durch die Membran offenbar ein noch nicht bekannter spezieller Mechanismus erforderlich ist. Einen solchen, besonderen Mechanismus der Translokation muß man, sofern nicht doch eine kryptische Signalsequenz vorhanden ist, auch für das Protein des Leserahmens A postulieren.

Leserahmen B zeigt bezüglich der Sekundärstruktur (Fig. 25) und Hydrophobizität etwas andere Charakteristika als Leserahmen A. Die Analyse nach Chou und Fasman ergab 29-36% α -Helix, 45-50% β -Faltblatt und 5-14% "turns" (Fig. 25). Von den 452 Aminosäuren sind 46 geladen, davon sind 24 saure und 22 basische Reste (Tab. 17; Fig. 24). Die Verteilung der geladenen Aminosäuren gestaltet sich derart, daß drei enge Bereiche von besonderer Hydrophilizität (Aminosäuren 108-114, 322-331, 438-445) dieses ansonsten durchwegs hy-

drophobe Molekül in insgesamt drei hydrophobe Domänen (Aminosäuren 1-100, 108-320, 325-451) aufteilt (Fig. 24, 25). Auffallend ist der saure Charakter des Carboxy-Terminus, wohingegen das hydrophobe Aminoende nur von einigen basischen Resten unterbrochen ist. Die gemäß der Chou-Fasman-Analyse vorhergesagte Sekundärstruktur (Fig. 25) und die extreme Hydrophobizität dieses Proteins macht eine Einordnung als integrales Membranprotein wahrscheinlich. Dennoch bleibt festzustellen, daß auch hier keine, für Signalpeptidhaltige Membranproteine typische Sekundärstruktur zu finden ist, so daß analog zur Situation des Proteins von Leserahmen A, ein anderer Mechanismus der Protein-Translokation postuliert werden muß. Die Verhältnisse beim Protein des Leserahmens B sind vergleichbar mit denen des *traJ*-Gens des F-Plasmid Transfer Operons (Fowler *et al.*, 1983), das, obgleich in der äußeren Membran integriert, keine Signalsequenz aufweist. Man nimmt hier an, daß die Tertiärstruktur des *traJ*-Proteins kleine hydrophobe Regionen zu einer hydrophoben Domäne zusammenbringt und so eine Verankerung des Proteins in die äußere Membran ermöglicht. Die obig beschriebenen und in den Abbildungen von Fig. 24 und 25 aufgezeigten hydrophoben Regionen des Leserahmens B lassen einen für das *traJ*-Protein beschriebenen Mechanismus der Translokation diskutabel erscheinen.

Beide in Diskussion stehende Proteine (Leserahmen A und B) zeichnen sich durch extreme Hydrophobizität aus, die deren Einstufung als Membranproteine rechtfertigen könnten. Eine für Membranproteine typische Signalsequenz war aus der Aminosäuresequenz und Strukturvorhersagen nicht zu erschließen. Eine verbindliche Aussage darüber, ob nun eine nicht ersichtliche Signalsequenz dennoch vorhanden ist, läßt sich erst durch einen Vergleich der elektrophoretischen Mobilität der im *in vitro*- und *in vivo*-System synthe-

tisierten Proteine machen. Erste Untersuchungen darüber (Kollenda, 1985) deuteten auf keine proteolytische Aktivität in Form einer Signalpeptid-Abspaltung hin, da das elektrophoretische Laufverhalten der in beiden Systemen erzeugten Proteine identisch war.

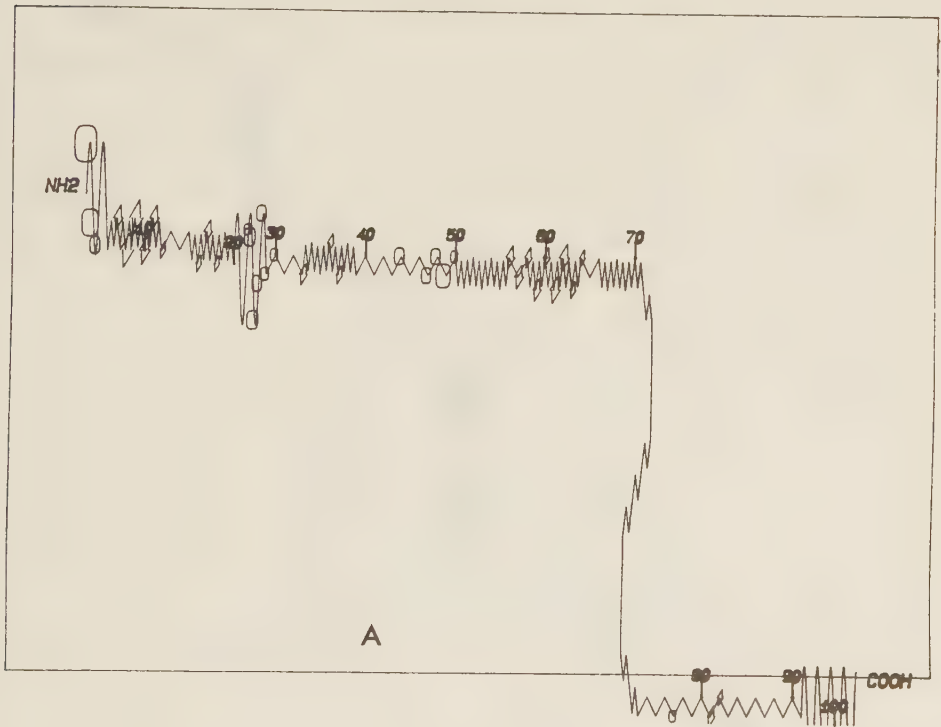


Fig. 25: Vorhersage der Sekundärstruktur und Hydrophilizitätsmuster der Proteine A und B

A: Protein A B: Protein B (S.156)

Ovale ($\bigcirc$): hydrophile Bereiche

Rauten ($\diamond$): hydrophobe Bereiche

($\sim$): Wendepunkte in der Kette

($\sim$): α -Helices

($\sim$): β -Faltblattstruktur

Bei Protein B sind, im Vergleich zu Protein A, die erklärten Zeichen in einem größeren Maßstab dargestellt.



4.6. KLONIERUNG DES ZUM RIFAMPICIN-RESISTENZGEN 3drif HOMOLOGEN GENS AUS DEM WILDTYP *E.coli* AB1157

Äußerst interessant ist die Klärung der Frage, welche molekularen Veränderungen in der aus der Mutante 10/lt klonierten DNA für die Manifestierung der Rifampicin-Resistenz im Klon 3drif verantwortlich zeichnen könnte. Diese Frage kann durch eine vergleichende Analyse des aus der Nitrosoguanidin-Mutante 10/lt klonierten Resistenzgens mit der homologen DNA des Wildtypstammes *E.coli* AB1157 auf DNA-Ebene beantwortet werden. Hierfür muß von der chromosomalen DNA aus AB1157 eine Genbank angelegt werden. Innerhalb dieser Genbank muß das dem Resistenzgen analoge DNA-Fragment ausfindig gemacht werden, um es einer eingehenden Analyse unterziehen zu können.

4.6.1. Erstellung einer Genbank aus *E.coli* AB1157 im Vektor pUC12

Prinzipielle Überlegungen für die Etablierung einer Genbank wurden bereits in Kap. 4.2.1. angestellt. Die für die Klonierung zu wählende Größe von DNA-Fragmenten war durch die bekannte Länge des Resistenzgens (2154 bp) vorgegeben. Als Restriktionsenzym für die partielle Verdauung der genomischen DNA wurde, wie schon bei der 10/lt-Genbank, *Sau3AI* verwendet. Als Klonierungsvehikel wurde das Plasmid pUC12 eingesetzt.

Die chromosomale DNA des Wildtyps AB1157 wurde gemäß der Vorschrift in Kap. 3.3.1. isoliert und mit *Sau3AI* partiell gespalten. Die hydrolysierte DNA wurde über ein 0.7% Agarosegel aufgetrennt und der interessierende DNA-Bereich (DNA im Größenbereich zwischen 2 und 2.5 kb) durch Elektroelution isoliert (siehe Kap. 3.3.7.). Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde im molaren Verhältnis von

3:1 (Vektor:Insert) in den mit *Bam*HI linearisierten und alkalischer Phosphatase dephosphorylierten Vektor pUC12 ligiert und in JM83-Zellen transformiert (vgl. 3.4.6. und 3.1.4.). Die rekombinanten Klone waren durch den Verlust der α -Komplementation an ihrer weißen Farbe zu erkennen, wohingegen Wildtypplasmide wegen ihrer aktiven β -Galaktosidase sich durch Blaufärbung auszeichneten. Die durchgeführten Transformationen ergaben einen 99%igen Anteil an weißen (rekombinanten) Klonen. Insgesamt wurden in diesem Experiment 25000 weiße Kolonien erhalten.

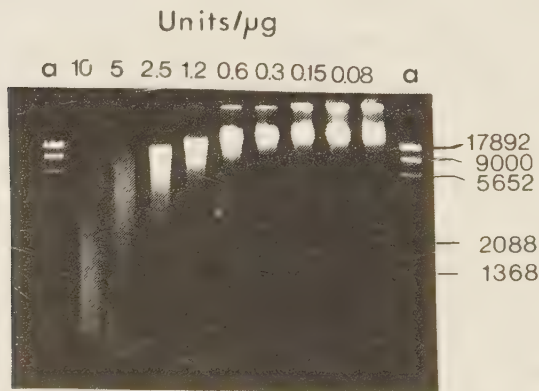


Fig. 26: Präparation von 2-2.5 kb-Fragmenten aus der genomischen DNA von *E. coli* AB1157

Jeweils 5 μ g der bakteriellen DNA wurden mit verschiedenen Enzymmengen (U/ μ g) *Sau*3AI 1 Stunde bei 37°C inkubiert und über ein 0.7%-Agarosegel analysiert. Als DNA-Längenstandard diente die mit *Xba*I gesplattene Ad2-DNA (Spur a). Der DNA-Bereich, der einer Größe zwischen 2 und 2.5 kb entsprach, wurde aus dem Gel geschnitten und durch Elektroelution isoliert (vgl. 3.3.7.). Die so gewonnene DNA wurde für die Konstruktion der AB1157-Genbank in pUC 12 verwendet, wobei in der Ligasereaktion ein molares Verhältnis von 3:1 (Vektor:Insert) gewählt wurde.

Eine wichtige Frage ist die statistische Wahrscheinlichkeit der vollständigen Repräsentierung des Genoms von AB1157 innerhalb dieser Genbank. Die exakte Wahrscheinlichkeit, daß irgendeine Sequenz in der Genbank repräsentiert ist, läßt sich, wie bereits in Kap. 4.2.1. erwähnt, nach der Formel von Clarke und Carbon (1976) ermitteln. Um mit einer 99%igen Wahrscheinlichkeit eine bestimmte DNA-Sequenz in einer Genbank von 2-2.5 kb-Fragmenten des *E.coli*-Genoms (3750 kb, Winnacker, 1984) repräsentiert zu haben, benötigt man mindestens 8065 Klone, gemäß:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln[1-2000/3.75 \times 10^6]} = 8065$$

Wie man aus dieser Zahl ersieht, war die erstellte Genbank mit den 25000 Klonen statistisch dreifach repräsentiert.

Zur Überprüfung der Komplexität der Genbank wurden 30 Klone willkürlich ausgewählt und von jedem eine Plasmid-Minipräparation durchgeführt. Die Größe der Insertionen wurde durch Hydrolyse der Plasmid-DNA mit *Bam*HI und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte bestimmt. Die ermittelten Fragmentlängen bewegten sich in dem erwarteten Ausmaß von 2-2.5 kb. Zudem wurde jede Plasmid-DNA mit einem Restriktionsenzym mit 4bp-Erkennungssequenz (*Hae*III) hydrolysiert, wobei jeder Klon ein ihm eigenes Spaltmuster aufwies (nicht gezeigt). Diese Befunde erlauben die Aussage, daß die untersuchten Klone unterschiedliche Insertionen enthielten und somit auch die Bedingungen für die Komplexität der erstellten Genbank erfüllt waren.

4.6.2. "Screening" der AB1157 Genbank mit dem Oligonukleotid W1

Um das Durchmustern der Genbank übersichtlich zu gestalten, wurden 10000 Klone aus der obig beschriebenen Genbank (ca. 8000 Klone sind für eine 99%ige Repräsentierung erforderlich) in einem definierten Raster zu je 1000 Kolonien auf ampicillinhaltige (100 µg/ml) LB-Agarplatten (Ø 15cm) gepickt. Nach Angaben von Hanahan und Meselson (1980) werden Plasmide auf chloramphenicolhaltigen Agarplatten amplifiziert, wodurch beim Absuchen der Genbank mit einer radioaktiven Probe positive Klone um ein Vielfaches besser identifiziert werden können. In Anlehnung an diese Methode wurden zunächst "Replica"-Filter der gesamten Genbank hergestellt, wobei "Hybond"-Nylonfilter (Amersham) verwendet wurden. Diese wurden danach auf chloramphenicol- (150 µg/ml) + ampicillinhaltige (50 µg/ml) Agarplatten übertragen und für 20 Stunden bei 37°C bebrütet (vgl. Kap. 3.1.7.).

Die Genbank wurde nach dem Koloniehybridisierungsverfahren (Hanahan and Meselson, 1980) unter Benutzung des am 5'Ende mit gamma-[³²P]-ATP markierten 19mer Oligonukleotids W1 durchgemustert. Oligonukleotide eignen sich wegen ihres hohen Grades an Hybridisierungsspezifität und -effizienz hervorragend als Probe für die Identifizierung einer klonierten DNA (Itakura *et al.*, 1984). Die Sequenz des hier verwendeten Oligonukleotids W1 entstammt der 5'nicht-translatierten Region des sequenzierten Resistenzgens 3dr^r (Pos. 224-242: 5'-AAAGTCATGTTGGTTTCGC-3'). Die experimentellen Einzelheiten bezüglich den Hybridisierungsbedingungen sind der Legende zu Fig. 27 bzw. dem Methodenteil (Kap. 3.5.4.) zu entnehmen. Nach dem ersten Waschen der hybridisierten Filter und anschließender Autoradiographie unter weniger stringenten Bedingungen (A in Fig. 27) waren, neben einem relativ starken Hintergrund,

zwei deutliche Signale zu sehen. Die Autoradiographie nach stringenterem Waschen der Filter (B in Fig. 27) ließ wieder zwei deutliche Signale, aber einen nur noch schwachen Hintergrund erkennen, wobei diese beiden Signale sich in der Intensität unterschieden. Die diesen beiden Signalen entsprechenden Klone wurden für die weitere Untersuchung herangezogen und werden im folgenden als WT- α und WT- β bezeichnet.

zu Fig. 27:

"Replica"-Filter der gesamten Genbank wurden zur Amplifizierung der Plasmide auf chloramphenicolhaltige (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Agarplatten über Nacht inkubiert (vgl. Methodenteil 3.1.7.). Anschließend wurden die Filter für 10 min auf ein mit 0.5 M NaOH getränktes Whatman 3MM Papier gelegt und zur Neutralisation wurden die Filter für 2x 10 min auf ein mit 1 M Tris-HCl, pH 8.0, 1.5 M NaCl durchtränktes Saugpapier transferiert und danach für 2 h bei 80°C gebacken. Für die Hybridisierung wurden die Filter zunächst in einer Lösung 6x NET, 10x Denhardt's und 0.1% SDS befeuchtet und danach für 2 h in der 52°C warmen Hybridisierungslösung belassen. Die Hybridisierungslösung bestand aus: 6x NET, 10x Denhardt's, 0.1% SDS und dem mit [^{32}P] 5'-endmarkiertem Oligonukleotid W1 (10⁶ cpm/ml, etwa 0.002 μM).

A) Die Filter wurden 3x für 5 min mit 6x SSC bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend autoradiographiert.

B) Die Filter wurden noch einmal 2 min lang mit 6x SSC bei 50°C gewaschen und anschließend autoradiographiert.

Das Zeichen α kennzeichnet den positiven Klon (WT- α), das Zeichen β den negativen Klon (WT- β). Die Zusammensetzung der einzelnen Puffer sowie das Hybridisierungsverfahren finden sich im Methodenteil.

A



B



Fig. 27: Koloniehybridisierung der AB1157-Genbank mit dem [^{32}P]-markierten Oligonukleotid 5'-AAAGTCATGTTGGTTTCGC-3'

4.6.3. Charakterisierung der Klone WT- α und WT- β

Die Plasmid-DNA der beiden selektionierten Klone wurde über CsCl-Gleichgewichtszentrifugation isoliert und die Größe der Insertion durch Restriktionsanalyse mit *Bam*HI zu ca. 2100 bp (WT- α) und zu ca. 2000 bp (WT- β) bestimmt. Die Insertionen der beiden Plasmide wurde mit einer Vielzahl an Restriktionsenzymen kartiert. Hierbei zeigte es sich schnell, daß das Restriktionsmuster des Klons WT- α mit dem des Resistenzgens 3d^{rif} identisch war (Fig. 28).

Klon- β hingegen wies ein völlig anders geartetes Spaltmuster auf. Um nun genauere Aussagen über Homologiebeziehungen zwischen WT- α und WT- β einerseits und zwischen WT- α , WT- β und 3d^{rif} andererseits machen zu können, wurden die Insertenden beider Klone nach dem Verfahren der Plasmidsequenzierung unter Verwendung von Universal- bzw. Reverse-Primer ansequenziert. Auf diese Weise konnten von jedem Klon 250 bp des 5'-und des 3'-Endes der Insertion bestimmt werden (vgl. Fig. 29). Ein Vergleich der ermittelten Sequenzen mit der Sequenz des Resistenzgens 3d^{rif} ergab eine völlige Übereinstimmung der Insertionsenden von WT- α mit den von 3d^{rif}. Die ermittelten Sequenzen von WT- β zeigten weder Homologie zu WT- α noch zu 3d^{rif}. Eine vergleichende Computeranalyse mit den Daten einer Genbank (Beckman: Microgenie) deckte auch keinerlei Homologie mit bereits sequenzierten Genen auf. Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb Klon WT- β nicht mehr herangezogen.

Die Restriktionsanalyse von Klon WT- α und die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz seiner Fragmentenden mit denen von 3d^{rif} zeigten deutlich, daß mit dem Klon WT- α das homologe Wildtyp-Gegenstück zu dem aus der Mutante 10/lt isolierten Klons 3d^{rif} gefunden war.

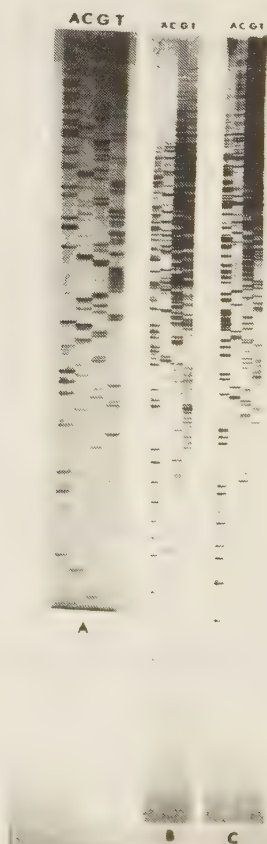
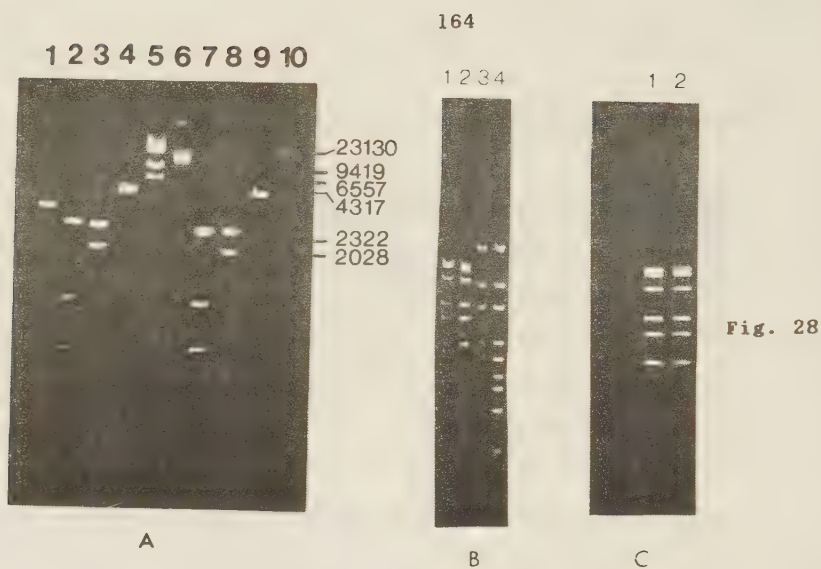


Fig. 28: Vergleichende Restriktionsanalyse der Plasmide von Klon WT- α und Klon 3d^{rif}

A: Je 1 μ g Plasmid-DNA wurde mit *EcoRI/HindIII*, *BamHI* und *HindIII* gespalten und über ein 0.8%-Agarosegel aufgetrennt.

B und C: Je 0.5 μ g des isolierten *BamHI*-Fragments von Klon WT- α und Klon 3d^{rif} wurden mit *HaeIII* bzw. mit *MspI* gespalten und über ein 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt.

- | | |
|--|---|
| A) Spur 1: WT- α , ungespalten | Spur 6: 3d ^{rif} , ungespalten |
| " 2: WT- α / <i>EcoRI/HindIII</i> | " 7: 3d ^{rif} / <i>EcoRI/HindIII</i> |
| " 3: WT- α / <i>BamHI</i> | " 8: 3d ^{rif} / <i>BamHI</i> |
| " 4: WT- α / <i>EcoRI</i> | " 9: 3d ^{rif} / <i>EcoRI</i> |
| " 5: Lambda-DNA/ <i>HindIII</i> | Spur 10: Lambda-DNA/ <i>HindIII</i> |
| | |
| B) Spur 1: WT- α / <i>HaeIII</i> | Spur 3: WT- α / <i>MspI</i> |
| " 2: 3d ^{rif} / <i>HaeIII</i> | " 4: 3d ^{rif} / <i>MspI</i> |
| | |
| C) Spur 1: WT- α / <i>HaeIII</i> | |
| " 2: 3d ^{rif} / <i>HaeIII</i> | |

Fig. 29: Sequenzanalyse der Fragmentenden der selektionierten Klone WT- α und WT- β

Die Nukleotidsequenz der Enden der Insertion von Klon WT- α (in pUC12) wurde unter Verwendung von Universal- bzw. Reverse-Primer bestimmt. Klon WT- β wurde nur mit dem Universalprimer ansequenziert. Die Auftrennung der sequenzierten Proben erfolgte über ein 6%, keilförmiges Sequenzgel.

- A) Sequenzanalyse von Klon WT- α mit Reverse-Primer
- B) Sequenzanalyse von Klon WT- α mit Universalprimer
- C) Sequenzanalyse von Klon WT- β mit Universalprimer

- Verhalten von Klon WT- α gegenüber Rifampicin

Das einzige, zunächst erkennbare Kriterium, in welchem sich Klon WT- α von Klon 3d^{rif} unterschied, war das Verhalten gegenüber Rifampicin. Zeigte Klon 3d^{rif} (sowohl in pBR322 als auch in pUC8) eine deutlich ausgeprägte Resistenz gegenüber Rifampicin, so erwies sich Klon WT- α als äußerst sensitiv gegenüber Rifampicin (Tab. 19). Die minimale Hemmkonzentration an Rifampicin (5 $\mu\text{g/ml}$) liegt in derselben Größenordnung wie die mit dem Wildtyp-Plasmid pUC12 infizierten *E.coli* JM83-Zellen.

Bakterienstamm	Minimale Hemmkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] Rifampicin	Resistenzfaktor
JM83/pUC12	5	1
JM83/WT- α (pUC12)	5	1
JM83/3d ^{rif} (pUC12)	100	20

Tab. 19: Minimale Hemmkonzentration an Rifampicin von Klon WT- α

Auch in Flüssigkultur war in Anwesenheit von 5 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin im Nährmedium keinerlei Wachstum festzustellen. Da in keiner der möglichen Kultivierungsformen eine Resistenz von Klon WT- α gegenüber Rifampicin zu verzeichnen war, erübrigte sich der Versuch des RNA Polymerase-Aktivitätstests.

4.6.4. SEQUENZANALYSE DES KLONS WT- α

Äußerst interessant gestaltete sich nun die Frage, welche molekularen Veränderungen für die Manifestierung der Resistenz von Klon 3d^{rif} verantwortlich sind. Da die vergleichende Restriktionsanalyse zwischen WT- α und 3d^{rif} (vgl. Fig. 28) keinerlei Unterschiede im Spaltmuster aufzeigen konnte, mußte zunächst davon ausgegangen werden, daß entweder Basenaustausche oder kurze Deletionen bzw. Insertionen, welche mit dem Auflösungsvermögen des verwendeten Gelsystems nicht detektiert werden können, die Ursache für die Ausbildung der Resistenz darstellen. Die fehlende Kenntnis über die Lage der möglichen Mutationsorte war Anlaß für die Entscheidung, die Nukleotidsequenz der Insertion von Klon WT- α ebenfalls vollständig zu bestimmen.

Die Sequenzierungsstrategie (siehe Fig. 30) für das Wildtypgen erfolgte nach demselben Schema wie beim Resistenzgen (vgl. Fig. 16 und Kap. 4.5.2.). Das isolierte Insert von Klon WT- α wurde in Parallelansätzen mit den Enzymen *Hae*III, *Msp*I, *Rsa*I und *Taq*I gespalten und die dabei erhaltenen Fragmente über ein 5% Polyacrylamidgel bzw. 1.6% Agarosegel aufgetrennt. Die einzelnen Fragmente wurden mittels Salzelution bzw. DEAE-Membranfiltriertechnik isoliert und in die kompatiblen Stellen des Vektors pUC12 kloniert (siehe auch 4.5.2.). Die Überprüfung der Klone geschah durch Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNAs mit *Eco*RI+*Hind*III. In der Abbildung der Sequenzierungsstrategie (Fig. 30) findet sich ein Überblick der für die Sequenzierung ausgewählten Klone. Die dabei eingesetzte Technik bestand durchwegs in der Plasmidsequenzierung, wobei für die Güte der Proben die Qualität der durch Minipräpara-

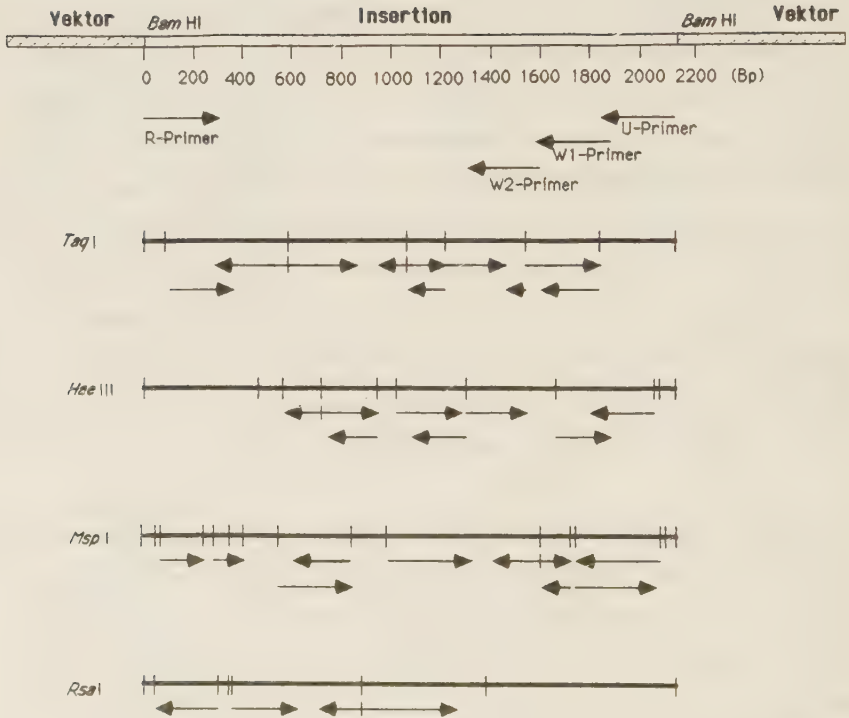


Fig. 30: Sequenzstrategie von Klon WT- α und Überblick der Subklone

Zur Gewinnung der Subklone wurde das *Bam*HI-Fragment von Klon WT- α mit obig angeschriebenen Restriktionsenzymen gespalten, die dabei entstandenen Fragmente über DEAE-Membranfilter isoliert und in die kompatiblen Stellen von pUC12 kloniert. Die Restriktionskarte der verwendeten Enzyme entstammt der Nukleotidsequenz. Die Pfeile geben Umfang und Ausgangspunkt jeder Sequenzanalyse an. Die Subklone wurden sowohl mit dem Universal- als auch mit dem Reverse-Primer sequenziert.

Sequenzierungen am gesamten *Bam*HI-Fragment wurden zudem mit dem Universal-, dem Reverse-, dem W1- und dem W2-Primer durchgeführt.

tion kleiner Übernachtskulturen gewonnenen Plasmid DNAs ausreichte. Die Insertionen wurden unter Verwendung von Universal- bzw. Reverse-Primer von beiden Enden sequenziert. Die bereits bei der Sequenzierung des Rifampicin-Resistenzgens $3d^{rif}$ verwendeten Primer W1 und W2 gelangten auch hier wieder zum Einsatz.

Mit Hilfe dieser Strategie konnte die vollständige Nukleotidsequenz der Insertion von Klon WT- α bestimmt werden. Die Auswertung aller Sequenzdaten wurden unter Verwendung eines Computerprogrammes (Beckman: Microgenie) durchgeführt und die Länge des Gesamtfragments zu 2149 bp bestimmt (vgl. Fig. 31, 32, 33). Jede Base wurde 3-4 Mal sequenziert, so daß die ermittelte Nukleotidsequenz eigentlich gesichert sein mußte.

Fig. 31: Nukleotidsequenz des zum Rifampicin-Resistenzgen $3d^{rif}$ homologen DNA-Abschnitts von Klon WT- α und die entsprechende Aminosäuresequenz der Genprodukte

Die Bezifferung der Nukleotidsequenz beginnt im 5'-nicht-translatierten Bereich. Die potentiellen Aminosäuresequenzen der Leseraster A (321-638) und B (726-1421) sind im Drei-Buchstaben-Code angezeigt. Die -10 und -35-Regionen der zwei möglichen Promotoren P1 und P2 sind durch horizontale Linien gekennzeichnet. Mögliche Initiationsstellen der Transkription sind durch Punkte unterhalb der Basen markiert (Nukleotidpositionen 214, 307, 310). Zwei umgekehrte Repetitionen, die eventuell an der Transkriptionstermination beteiligt sind, findet man an den Positionen 53-76 und 686-707, und sind durch horizontale Pfeile angezeigt. Die beiden ribosomalen Bindungsstellen (Pos. 310 und 712) sind unterstrichen und durch das Kürzel SD markiert.

32
GG ATC CAC AGG CTG CGA AGT AAT CAA TTC GTC

62
TGA AAG CTT GAG TAA CAA CGG AAA CCG GCC

92
ATT GCG CCG GTT TTT TTT GGC CTG AGT TCT

122
TAA TTA TCT TCG CGA ATT ATT TGC CCG AAA

152
TGT GAA GAG GGT CAT AAC CAC AGG TCA AGG

182
AGA AAC AAT TTA TAA GGT CAA AGA AAT ACT

212
ATT GCT CAG GTC TAT ACC GTA TAC TCC TTT
-35 (P1) -10 (P1)

242
CAG CCA CAA AAA AAG TCA TGT TGG TTT CGC

272
AAG TTA CCC AGA GCA TGG AAG CAG GTT AAG

302
GCT TGC GGA GTG TCT GGC TGA CAG ATA ATC
-35 (P2) -10 (P2)

332
GTC GAT GAG GGC AGT TTT ATG GAA AAG AAA
A
Met Glu Lys Lys
SD

362
CAC ATT TAT CTG TTT TGT TCT GCG GGC ATG
His Ile Tyr Leu Phe Cys Ser Ala Gly Met

392
TCT ACC TCT TTA CTG GTA TCA AAA ATG CGC
Ser Thr Ser Leu Leu Val Ser Lys Met Arg

422
GCA CAG GCA GAA AAA TAT GAA GTT CCG GTC
Ala Gln Ala Glu Lys Tyr Glu Val Pro Val

452
ATT ATT GAA GCA TTT CCG GAA ACA CTG GCT
Ile Ile Glu Ala Phe Pro Glu Thr Leu Ala

482
GGT GAA AAA GGT CAG AAT GCC GAT GTC GTG
Gly Glu Lys Gly Gln Asn Ala Asp Val Val

512
TTA TTA GGG CCG CAG ATT GCT TAT ATG TTG
Leu Leu Gly Pro Gln Ile Ala Tyr Met Leu

542
 CCC GAA ATC CAG CGT TTG TTA CCC AAC AAA
 Pro Glu Ile Gln Arg Leu Leu Pro Asn Lys

572
 CCG GTT GAA GTA ATT GAC TCG CTG CTT TAT
 Pro Val Glu Val Ile Asp Ser Leu Leu Tyr

602
 GGC AAA GTC GAT GGT TTA GGC GTG CTT AAG
 Gly Lys Val Asp Gly Leu Gly Val Leu Lys

632
 GCT GCG GTT GCA GCG ATT AAA AAA GCC GCA
 Ala Ala Val Ala Ala Ile Lys Lys Ala Ala

662
 GCA AAT TAA TTT ATT TTA AAT TTT CCC GTC
 Ala Asn End

692
 AAA GAG TTA TTT CAT AAA TCA ATA CCG CAA

722
 TAT TTA AAT TGC GGT TTT TAA GGG TAT TTT

SD

B 752
 TCT ATG AGT AAT GTT ATT GCA TCG CTT GAA
 Met Ser Asn Val Ile Ala Ser Leu Glu

782
 AAG GTA CTC CTC CCT TTT GCA GTT AAA ATA
 Lys Val Leu Leu Pro Phe Ala Val Lys Ile

812
 GGA AAG CAG CCA CAC GTT AAT GCA ATC AAA
 Gly Lys Gln Pro His Val Asn Ala Ile Lys

842
 AAT GGC TTT ATT CGC TTA ATG CCG TTT AAC
 Asn Gly Phe Ile Arg Leu Met Pro Phe Asn

872
 CTT GCG GGG GCC ATG TTT GTA TTA ATT AAC
 Leu Ala Gly Ala Met Phe Val Leu Ile Asn

902
 AAC GTT TTT CTA AGC TTT GGG GAG GGG TCG
 Asn Val Phe Leu Ser Phe Gly Glu Gly Ser

932
 TTT TTT TAT TCC TTA GGT ATT CGC CTC GAC
 Phe Phe Tyr Ser Leu Gly Ile Arg Leu Asp

962
 GCC TCA ACC ATT GAA ACA CTT AAT GGT CTG
 Ala Ser Thr Ile Glu Thr Leu Asn Gly Leu

992
 AAA GGT ATT GGC GGC AAC GTA TAT AAC GGA
 Lys Gly Ile Gly Gly Asn Val Tyr Asn Gly

1022
 ACA TTA GGA ATA ATG TCT TTA ATG GCA CCG
 Thr Leu Gly Ile Met Ser Leu Met Ala Pro

1052
 TTC TTT ATT GGC ATG GCG CTG GCA GAA GAG
 Phe Phe Ile Gly Met Ala Leu Ala Glu Glu

1082
 CGT AAA GTC GAT GCG CTG GCG GCT GGG TTG
 Arg Lys Val Asp Ala Leu Ala Ala Gly Leu

1112
 TTA TCC GTT GCA GCA TTT ATG ACC GTC ACC
 Leu Ser Val Ala Ala Phe Met Thr Val Thr

1142
 CCA TAT AGT GTC GGT GAG GCC TAT GCG GTT
 Pro Tyr Ser Val Gly Glu Ala Tyr Ala Val

1172
 GGT GCA AAC TGG TTA GGT GGG GCG AAT ATC
 Gly Ala Asn Trp Leu Gly Gly Ala Asn Ile

1202
 ATC TCC GGG ATT ATT ATT GGC CTG GTG GTG
 Ile Ser Gly Ile Ile Ile Gly Leu Val Val

1232
 GCA GAA ATG TTT ACC TTT ATT GTC CGC CGC
 Ala Glu Met Phe Thr Phe Ile Val Arg Arg

1262
 AAT TGG GTC ATT AAA CTG CCC GAC AGC GTG
 Asn Trp Val Ile Lys Leu Pro Asp Ser Val

1292
 GGG ACC TGC TTC AGT ATC GCG TTC CTT CTC
 Gly Thr Cys Phe Ser Ile Ala Phe Leu Leu

1322
 GGC ATT AAT TCC CGG CTT TAT TAT TCT TTC
 Gly Ile Asn Ser Arg Leu Tyr Tyr Ser Phe

1352
 CGT GAT GGG GAT TAT TGC CTG GGC GTT GAA
 Arg Asp Gly Asp Tyr Cys Leu Gly Val Glu

1382
 TAC CTG GGG CAC CAA CTT CCA TCA GAT CAT
 Tyr Leu Gly His Gln Leu Pro Ser Asp His

1412
 TAT GGA TAC CAT CTC AAC CCC ACT GGC ATC
 Tyr Gly Tyr His Leu Asn Pro Thr Gly Ile

1442
 GTT GGG TAG CGT GGT GGG CTG GGC CTA TGT
 Val Gly End

1472
 GAT CTT TGT TCC ACT GCT CTG GTT CTT CGG

1502
 TAT TCA TGG CGC GCT GGC GCT GAC CGC ACT

1532
 GGA CAA CGG CAT TAT GAC GCC GTG GGC ACT

1562
 GGA AAA TAT CGC GAC CTA TCA GCA ATA TGG

1592
 TTC CGT CGA AGC GGC GCT GGC AGC CGG TAA

1622
 GAC CTT CCA TAT CTG GGC CAA GCC GAT GCT

1652
 GGA CTC CTT TAT TTT CCT TGG GGA AAA TGG

1682
 TGC GAC TTT AGG CCT GAT CCT GGC TAT CTT

1712
 TAT CGC CTC TCG CCG TGC TGA TTA TCG TCA

1742
 GGT GGC AAA ACT GGC GCT GCC GTC CGG CAT

1772
 CTT CCA GAT TAA CGA ACC GAT TCT GTT TGG

1802
 TCT GCC AAT TAT CAT GAA CCC GGT GAT GTT

1832
 TAT CCC GTT TGT ACT GGT ACA ACC GAT TCT

1862
 GGC GGC AAT CAC CCT CGC AGC GTA CTA CAT

1892
 GGG CAT TAT TCC TCC GGT GAC CAA TAT TGC

1922
 ACC GTG GAC CAT GCC AAC CGG TCT GGG AGC

1952
 CTT CTT TAA CAC CAA CGG TAG CGT CGC CGC

1982
ATT GCT GGT CGC ACT CTT CAA CCT TGG CAT

2012
CGC AAC GTT AAT TTA TCT GCC CTT TGT TGT

2042
GGT GGC TAA CAA AGC ACA AAA TGC GAT TGA

2072
TAA AGA AGA GAG CGA AGA AGA TAT CGC TAA

2102
CGC CCT GAA ATT TTA ATC GAT GCC GGT ACG

2132
GGT AAT CGT GCC GGT AAG AAA AGA GAG GAA

CGA TGT ATG ATG GAT CC

4.6.5. Direkte Sequenzierung der genomischen DNA von *E.coli* AB1157 analog dem Verfahren der Plasmidsequenzierung

Im Zusammenhang mit der Frage nach Homologien zwischen dem klonierten Rifampicin-Resistenzgen und dem entsprechenden DNA-Bereich des Wildtypstammes *E.coli* AB1157 wurde versucht, auf schnelle Weise eine aussagekräftige Information über den Homologiegrad dieser beiden DNA-Bereiche zu erhalten. Die Idee dafür war, unter Verwendung eines Oligonukleotids als spezifischen Primer, an der genomischen, doppelsträngigen DNA eine Sequenzreaktion nach dem Dideoxy-Abbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977; Wallace *et al.*, 1981) durchzuführen. Eine bereits von Church und Gilbert (1984) beschriebene Methode zur Bestimmung genomischer DNA-Sequenzen beruht auf der basenspezifischen Spaltung und ist äußerst aufwendig in der Durchführung.

Da mit dem W1-Oligonukleotid aus der Sequenzierung des 3d^{rif}-Gens bereits ein der chromosomalen DNA homologer Primer zur Verfügung stand, wurde unter Verwendung dieses Primers eine direkte Sequenzreaktion an der chromosomalen *E.coli* AB1157-DNA durchgeführt. Die experimentellen Details dafür sind im Methodenteil (Kap. 3.8.) beschrieben und basieren größtenteils auf den in den Plasmidsequenzierungen gewonnenen Kenntnissen. Das in Fig. 32 dargestellte Sequenzgel zeigt das Ergebnis der Sequenzanalyse an der genomischen DNA von *E.coli* AB1157 unter Verwendung des W1-Oligonukleotids als Primer. Die Güte dieser genomischen Sequenzierung kann zwar mit der bei Plasmidsequenzierungen erhaltlichen nicht Schritt halten (relativ starker Hintergrund), dennoch lassen sich die Autoradiogramme problemlos auswerten. Die ermittelte Sequenz (Fig. 32) zeigt Übereinstimmung sowohl mit der des Rifampicin-Resistenzgens 3d^{rif} (Fig. 20/21) als auch mit dem homologen, aus *E.coli* AB1157

klonierten Gen WT- α (Fig. 31). Die Übereinstimmung der durch genomisches Sequenzieren ermittelten Sequenz erstreckt sich von Pos. 246 bis Pos.400.

Die technische Durchführbarkeit einer direkten Sequenzierung von genomischer DNA nach der Methode des Kettenabbruchverfahrens eröffnet die Möglichkeit der Identifizierung von Mutationen oder Deletionen in einem definierten Bereich innerhalb der genomischen DNA (vgl. Diskussionsteil).

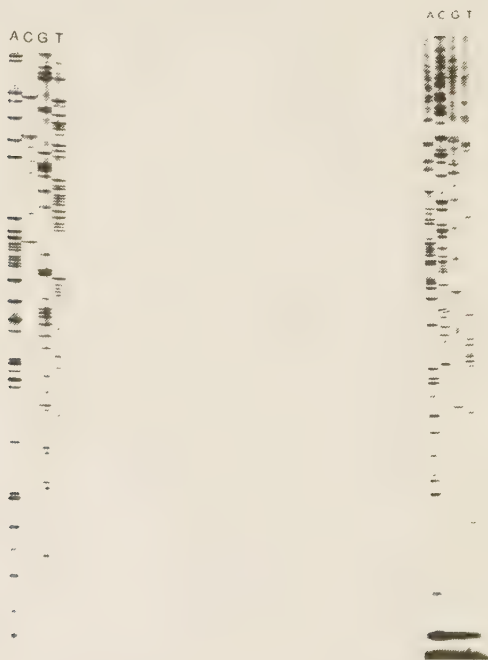


Fig. 32: Sequenzgel nach direkter Sequenzierung chromosomaler *E.coli* AB1157-DNA

10 μ g der chromosomalen DNA von *E.coli* AB1157 wurden mit *Bam*HI vollständig gespalten, anschließend phenolisiert und danach mit Ethanol präzipitiert. Die doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden Hitze-denaturiert und danach, unter Verwendung des W1-Oligonukleotids als Primer, in der im Methodenteil beschriebenen Sequenzreaktion eingesetzt.

4.6.6. ANALYSE DES SEQUENZIIERTEN KLONS WT- α

Die Sequenzanalyse von Klon WT- α ergab eine Fragmentlänge von 2149 bp und unterscheidet sich somit durch den Besitz von 4 zusätzlichen Basen vom Resistenzgen 3d^{rif}, welches 2145 bp aufweist (vgl. Fig. 21). Diese 4 zusätzlichen Basen kommen durch eine Insertion von 4 Gs an Position 1261 zustande. Bei Pos. 227 könnte noch ein, durch die Sequenzanalyse nicht eindeutig feststellbarer Basenaustausch von G→A vorliegen (vgl. Fig. 33). In allen anderen Positionen stimmt die Nukleotidsequenz des Wildtypklon WT- α mit der des davon abgeleiteten Resistenzgens 3d^{rif} völlig überein. Es bleibt nun die Frage zu diskutieren, zu welchen Konsequenzen auf molekularer Ebene diese oben beschriebenen Unterschiede in der Nukleotidsequenz führen. Der mögliche Basenaustausch von G→A (Pos. 227) liegt im 5'terminalen, nicht-kodierenden Bereich und betrifft also nicht die in Kap. 4.5.4. diskutierten Promotorstrukturen und sollte somit auf die Expression dieses Gens keinen Einfluß haben. Der Leserahmen A des Resistenzgens 3d^{rif} und dessen regulatorische Bereiche zeigen, bis auf diesen möglicherweise bedeutungslosen Basenaustausch in der nichttranslatierten Region, völlige Übereinstimmung mit der entsprechenden Sequenz des Wildtyp-Klons WT- α . Anders verhält sich die Situation beim Leserahmen B: die Insertion der vier Gs bei Position 1263 im Wildtyp-Klon WT- α führt zu einer Rasterverschiebung und damit zu einer Verkürzung dieses offenen Leserahmens im mutierten Gene. Als Folge davon ändert sich ab Position 1263 die Aminosäuresequenz, welche dann bei Pos. 1419 mit dem Stopcodon TAG abbricht. Der offene Leserahmen B des Wildtyp-Klons enthält 231 Codons, wobei das davon abgeleitete Molekular-

gewicht des entsprechenden Polypeptids zu 24866 Dalton bestimmt wurde. Die durch Nitrosoguanidin-Behandlung des Wildtypstammes AB1157 erzeugte Deletion von 4 Gs führt also in der Mutante 10/1t zu einer Änderung des Leserasters und damit zu einer Verlängerung des offenen Leserahmens um 223 auf 454 Aminosäuren. Dieses, im Vergleich zum Wildtyp-Genprodukt stark veränderte und doppelt so große Protein ist wohl als Ursache für die Ausbildung der Resistenz gegenüber Rifampicin anzusehen.

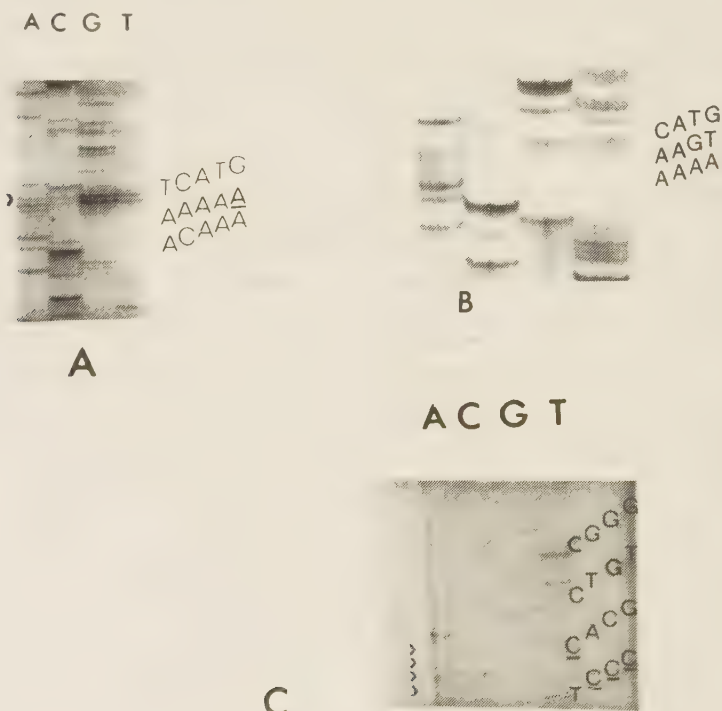


Fig. 33: Sequenzanalyse der gegenüber dem Rifampicin-Resistenzgen *3drif* veränderten Positionen im Wildtyp-Klon WT- α

Die Auftrennung der sequenzierten Proben erfolgte über ein 6xiges, keilförmiges Sequenzgel. Die gegenüber dem Resistenzgen *3drif* veränderten Positionen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

- A) Möglicher Basenaustausch von G $\rightarrow$ A an Pos. 227 (Wildtypklon WT- α)
 B) Entsprechende Sequenz der Mutante *3drif*
 C) Insertion von 4 Gs bei Pos. 1263

Die bereits beim Resistenzgen $3d^{rif}$ (vgl. Kap. 4.5.4.) angeschnittene Diskussion über das Fehlen eines Terminationssignals für die RNA-Synthese im 3'stromabwärts von Leserahmen B gelegenen Bereich, muß hier analogerweise fortgesetzt werden. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen eines deutlichen Terminationssignals ist wohl darin zu suchen, daß die ganze, hier aufgezeigte Sequenz Teil einer polycistronischen mRNA darstellt, dessen 3'Ende bei der Klonierung nicht erfaßt wurde.

Auffallend ist, daß in der Wildtyp-Sequenz bei Benutzung eines anderen Rasters ein offener Leserahmen auszumachen ist, der sich von Pos. 1159 bis Pos. 2085 erstreckt und damit immerhin für 309 Aminosäuren kodieren könnte. Es läßt sich jedoch keine Promotorstruktur und auch keine ribosomale Bindungsstelle erkennen, die darauf hindeuten könnten, daß ein von dieser Sequenz abgeleitetes Protein auch *in vivo* vorliegt. Die Analyse des Gegenstranges ergab erwartungsgemäß auch keine offenen Leserahmen, die mehr als 150 bp umfaßten. Im übrigen lassen sich alle für die Sequenz des Resistenzgens $3d^{rif}$ diskutierten Punkte auf die Sequenz des Wildtypklons WT- α übertragen.

4.7. VERGLEICH DES RIFAMPICIN-RESISTENZGENS 3d^{rif} MIT MU LYSOGENEN RIFAMPICIN-MUTANTEN

Kollenda *et al.* (1986) konnten durch lysogene Insertion der Bakteriophagen Mu cIts Ap-DNA (Leach and Symonds, 1979) eine neue Klasse von Rifampicin-resistenten *E.coli*-Mutanten gewinnen. Die Rifampicin-Resistenz ist hierbei eng gekoppelt mit der Ampicillin-Resistenz des Prophagen. Die Lokalisation der Mutation zur Rifampicin-Resistenz konnte durch Konjugationsexperimente mit auxotrophen Markern zwischen den Genorten *cysB* (28min) und *aroD6* (37min) auf der *E.coli* Chromosomenkarte festgesetzt werden und diesem Resistenzgen wurde der Name *rifM* gegeben. Der Insertionsort des Prophagen und damit der Mutationsort ist somit vom *rpoB* Gen (89.5min) weit entfernt, so daß Veränderungen der RNA Polymerase als Folge der Mutation wohl ausscheiden. Die RNA Polymerasen dieser Mutanten erwiesen sich auch als äußerst sensitiv gegenüber Rifampicin. Die physiologische Ursache dieser durch Mu-Insertion hervorgerufenen Resistenz ist zwar nicht bekannt, aber man betrachtet eine reduzierte Aufnahme des Antibiotikums als wahrscheinlich (Kollenda *et al.*, 1986). Es wurde bereits von Kollenda (1985) die Vermutung nahe gelegt, daß es sich generell bei allen, wenngleich auf völlig unterschiedliche Weise gewonnenen *rpoB*-unabhängigen Mutanten, um das gleiche Gen handelt, dessen Mutation zu einer Rifampicin-Resistenz führt. Sollte sich diese Vermutung als richtig erweisen, mußte auch der Genort des klonierten Resistenzgens 3d^{rif} an der gleichen Stelle auf der *E.coli* Chromosomenkarte (zwischen 28 min und 37 min) kartieren wie das *rifM*-Gen.

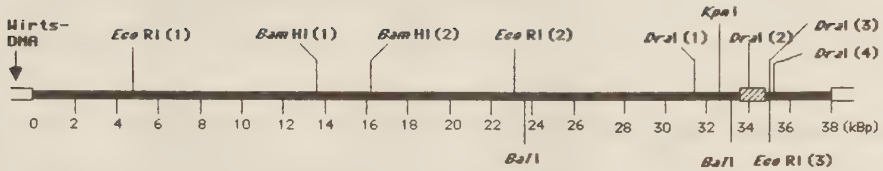


Fig. 34: Restriktionskarte der Mu cIts Ap-DNA

Da eine grobe Restriktionskarte der DNA des Bakteriophagen Mu bereits erstellt wurde (Kahmann *et al.*, 1977), bestand der Ansatz, diese Vermutung experimentell zu untermauern, darin, die DNA der Rifampicin-resistenten Mu-Mutanten zunächst zu isolieren, mit Restriktionsenzymen zu hydrolysieren und diese gegen die [^{32}P]-markierte DNA des Resistenzgens 3d^{rif} im Southern-Blot (Southern, 1975) zu hybridisieren. Durch Hydrolyse der genomischen DNA der Mu-Mutanten mit geeigneten Restriktionsenzymen sollte im Southern-Blot ein Bandenmuster erscheinen, welches einen Rückschluß erlaubt über die Homologie zwischen den Mu-Mutanten und dem durch Nitrosguanidin-Behandlung erzeugten Resistenzgen 3d^{rif}. Um der geplanten Hybridisierungsstrategie eine sichere Basis zu verleihen, wurde zunächst, unter Ausnutzung der Restriktionskarte des Phagen Mu cItsAp (Fig. 34), die DNA der Mu-Mutanten RifM1, M3 und M4 in Parallelansätzen mit den Enzymen *Bam*HI, *Eco*RI oder *Dra*I gespalten und in einer Southernblot-Analyse gegen das [^{32}P]-nicktranslatierte β -Lactamasegen (isoliert aus pBR322 als 2064 bp großes *Eco*RI-*Nde*I-Fragment) hybridisiert (Fig. 35). Zur Kontrolle wurde in der

gleichen Weise mit der DNA aus dem *E. coli* Wildtypstamm AB1157 (enthält nicht das β -Lactamasegen) verfahren. Aufgrund der Restriktionskarte des Phagen Mu (Fig. 34) war, eine korrekte Insertion des Phagen vorausgesetzt, folgendes Bandenmuster zu erwarten:

1. Hydrolyse der Mu-Mutanten mit *EcoRI*:

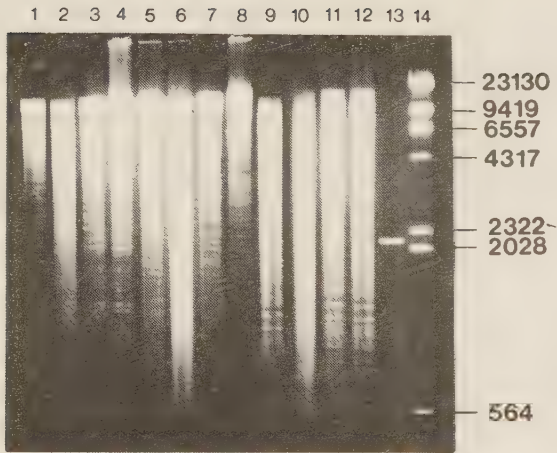
Die zwei, im Bereich der Mu cIts Ap-DNA befindlichen *EcoRI*-Stellen spalten diese in ein 18.4 kb großes, β -Lactamasegen-freies Fragment, in ein 4.8 kb (+ x kb 5'bakteriellen Anteil) großes, β -Lactamasegen-freies Fragment und in ein 13.8 kb (+ x kb 3'bakteriellen Anteil) großes, β -Lactamasegen-haltiges Fragment. Und nur dieses, mindestens 13.8 kb große DNA-Fragment sollte im Southernblot ein Signal ergeben.

2. Hydrolyse der Mu-Mutanten mit *BamHI*:

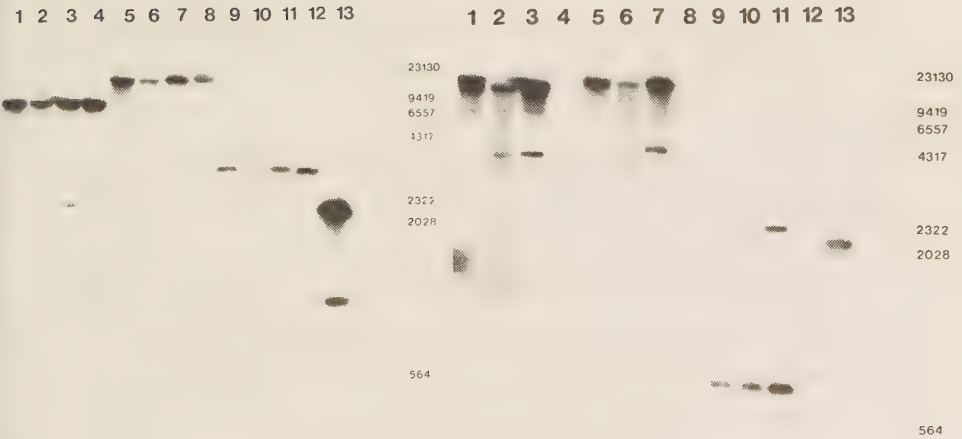
Innerhalb der Mu cIts Ap-DNA befinden sich zwei *BamHI*-Stellen, welche diese in ein 13.8 kb (+ x kb 5'bakteriellen Anteil), ein 2.4 kb und in ein 20.7 kb (+ x kb 3'bakteriellen Anteil) großes Fragment aufspaltet. Nur dieses, mindestens 20.7 kb große Fragment hat das β -Lactamasegen integriert und darf somit im Southernblot ein Signal ergeben.

3. Hydrolyse der Mu-Mutanten mit *DraI*:

In der Umgebung des integrierten Ap^r-Gens (im Ap^r-Gen selbst befindet sich 1 *DraI*-Stelle) finden sich mehrere *DraI*-Schnittstellen, die zwei *DraI*-Fragmente mit β -Lactamasegen-Anteil erwarten lassen (etwa 2.4 und 0.8 kb groß) und im Southernblot wieder zu finden sein müßten.



A



B

C

Fig. 35: Hybridisierung des β -Lactamase- und des 3d^{rif}-Gens an *Eco*RI, *Bam*HI, oder *Dra*I hydrolysierter Mu-Mutanten- und *E. coli* AB1157-DNA nach Southern (1975)

zu Fig. 35:

A: Auftrennung der zellulären DNA der Mu-Mutanten RifM1, RifM3, RifM4 sowie der aus *E.coli* AB1157 nach Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen in einem 0.7%igen Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid

Die DNA der Mu-Mutanten sowie des *E.coli* AB1157 wurde gemäß der Beschreibung im Methodenteil isoliert. Jeweils 10 µg wurde in Parallelansätzen mit den Enzymen *EcoRI*, *BamHI* bzw. *DraI* vollständig gespalten und in einem 0.7%igen Agarosegel bei einer Spannung von 3 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt.

Spur 1: RifM1 (<i>EcoRI</i>)	Spur 9: RifM1 (<i>DraI</i>)
Spur 2: RifM3 (<i>EcoRI</i>)	Spur 10: RifM3 (<i>DraI</i>)
Spur 3: RifM4 (<i>EcoRI</i>)	Spur 11: RifM4 (<i>DraI</i>)
Spur 4: AB1157 (<i>EcoRI</i>)	Spur 12: AB1157 (<i>DraI</i>)
Spur 5: RifM1 (<i>BamHI</i>)	Spur 13: 3d ^{rif} -Gen + das darin ent-
Spur 6: RifM3 (<i>BamHI</i>)	haltene, 0.85 kb große
Spur 7: RifM4 (<i>BamHI</i>)	<i>AluI</i> -Fragment
Spur 8: AB1157 (<i>BamHI</i>)	Spur 14: Lambda-DNA/ <i>HindIII</i>

Die Durchführung der Hybridisierung ist dem Methodenteil (Kap. 3.5.3. und 3.5.4.) zu entnehmen.

- B) Hybridisierungsmuster des 3d^{rif}-Gens an die fragmentierte, zelluläre DNA der Mu-Mutanten und des *E.coli* AB1157
- C) Hybridisierungsmuster des β -Lactamasegens an die fragmentierte, zelluläre DNA der Mu-Mutanten und des *E.coli* AB1157

Als Proben wurden verwendet:

- a) das [³²P]-nicktranslatierte Rifampicin-Resistenzgen 3d^{rif} und nach Abwaschen der hybridisierten DNA (das gleiche Filter wurde unter stringenten Waschbedingungen, vgl. 3.5.4., von der hybridisierten Probe befreit):
- b) das [³²P]-nicktranslatierte β -Lactamasegen (isoliert aus pBR322 als 2 kb großes *EcoRI*/*NdeI*-Fragment),

Die in Spur 13 von Gel C noch erkennbares Hybridisierungssignal ist auf eine unvollständige Entfernung der vorher hybridisierten Probe (3d^{rif}-Gen) zurückzuführen.

Die Auswertung dieser Hybridisierungsexperimente führte zu folgenden Ergebnisse (vgl. Fig. 35):

1. Hydrolyse mit *EcoRI*:

Alle drei Mu-Mutanten zeigen ein starkes Signal bei ca. 15 kb, welches dem geforderten 13.8 kb (+ x kb bakteriellen Anteil) Fragment entspricht. Zusätzlich findet man bei allen drei Mu-Mutanten eine deutliche, aber nicht erwartete 4.3 kb-Bande. Diese Bande könnte von einem zweiten Integrationsereignis des Mu-Phagen innerhalb des Genoms und einer anschließend erfolgten Deletion herrühren, wobei der Bereich des 3'Endes, inklusive dem Ap^r -Gen, intakt sein muß (vgl. *DraI*-Muster) und der Bruchpunkt in dem vom Ap^r -Gen 5'stromaufwärts gelegenen Bereich zu suchen ist.

2. Hydrolyse mit *BamHI*:

Gemäß der obigen Besprechung ist ein, einem mindestens 20.7 kb großen Fragment entsprechendes Signal zu erwarten. Tatsächlich aber findet man bei allen drei Mu-Mutanten (Spur 5, 6 und 7) ein Signal, welches einer Fragmentgröße von 16-18 kb entspricht und somit deutlich unterhalb der geforderten Fragmentlänge liegt. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, daß die Integration des Phagen Mu in diesen Mutanten in einer deletierten Form vorliegt, wobei der Deletionsort wohl zwischen der *BamHI*(2)- und der *EcoRI*(2)-Stelle zu lokalisieren ist. Auch hier beobachtet man ein nicht erwartetes, zusätzliches Signal, das einem etwa 5 kb-Fragment entspricht (Spur 5, 6, 7). Erklärbar ist das Erscheinen dieser Bande anhand der vorgegebenen Restriktionskarte nicht. Sie setzt, wie bereits oben in Punkt 1 diskutiert, ein zweites Integrationsereignis des Phagen innerhalb derselben Wirts-DNA voraus, wobei das 3'-Ende, inklusive dem Bereich des Ap^r -Gens (wegen des Signals), intakt sein muß, aber ein beträchtlicher Teil des 5'terminalen Bereiches entfernt wurde. Die für die Erzeugung des *BamHI*-Fragments erforderlichen

*Bam*HI-Stellen müssen dann im 5'-bzw. 3'-terminalen Bereich der Insertion gelegene, wirtseigene Schnittstellen sein.

3. Hydrolyse mit *Dra*I:

Das obig geforderte Spaltmuster mit einem ca. 2.4 kb- und einem ca. 0.8 kb-Fragment läßt sich hier zweifelsfrei beobachten. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß die Region um das β -Lactamasegen intakt integriert sein muß, da die *Dra*I-Stellen, wie aus dem Southernblot ersichtlich, noch erhalten sind und eine mögliche Bruchstelle demnach im 5'stromaufwärts gelegenen Bereich zu suchen ist. Die 0.8 kb-Signale zeigen eine wesentlich intensivere Schwärzung als die 2.4 kb-Signale. Der Grund dafür liegt darin, daß das 2.4 kb-Fragment nur einen ca. 0.2 kb großen β -Lactamasegen-Anteil aufweist. Das 0.8 kb-Fragment hingegen besitzt einen ca. 0.6 kb großen β -Lactamasegen-Anteil, was letztendlich zu einem intensiveren Signal führte. Dieser Befund läßt gleichzeitig einen Schluß auf die bislang noch unbekannte Orientierung des Ap^r -Gens innerhalb des Phagen Mu im Stamm Mu cIts Ap (Leach and Symonds, 1979) zu (Fig. 34). Wäre nämlich das Ap^r -Gen umgekehrt integriert als in Fig. 34 gezeichnet, würde sich das 2.4 kb große *Dra*I(1)-*Dra*I(2)-Fragment um ca. 0.6 kb vergrößern und das 0.8 kb große *Dra*I(2)-*Dra*I(3)-Fragment sich um den gleichen Betrag verringern und sich so auch die Intensität der Signale umkehren. Die als Kontrolle mitgetestete DNA aus dem *E.coli* Wildtyp AB1157 (Spur 4,8 und 12) zeigte erwartungsgemäß keine Banden, so daß alle im Blot ersichtlichen Signale auf eine Hybridisierung des Ap^r -Gens mit Mu-spezifischen DNAs zurückzuführen ist. Die zusätzlich im Blot erkennbaren schwachen Banden gehen wahrscheinlich auf unspezifische Kreuzhybridisierungen der Mu cIts Ap-DNA mit der Probe zurück.

Es sei hier betont, daß die eben besprochenen Ergebnisse nicht einem Einzelversuches entstammen, sondern die gewonnenen Daten in mehreren Wiederholungsversuchen immer wieder bestätigt wurden. Diesen Ergebnissen zufolge darf man eine mögliche zweifache Integration des Phagen Mu in das Wirtsgenom nicht ganz von der Hand weisen:

- a) eine Integration mit fast vollständiger Mu-DNA (eventuelle Deletionen zwischen der *Bam*HI- (2) und *Eco*RI- (2)-Stelle),
- b) Integration einer nur etwa 5 kb großen Region der Mu-DNA mit intaktem 3'-Ende.

In einem anderen Experiment wurde mit dem [32 P] nicktranslatierten Rifampicin-Resistenzgen *3d^{rif}* eine Hybridisierung an denselben DNA-Proben durchgeführt. Die Auswertung der Blots führte zu folgenden Ergebnisse (vgl. Fig 34 und 35):

1) Hydrolyse mit *Eco*RI:

Die drei Mu-Mutanten (Spur 1, 2, 3) zeigen ein starkes Signal bei etwa 9 kb und 2.2 kb. Das 9 kb-Signal erscheint mit gleich starker Intensität auch beim *E.coli* AB1157 (Spur 4).

2) Hydrolyse mit *Bam*HI:

Auf der Höhe von etwa 16 kb zeigen alle 3 Mu-Mutanten (Spur 5, 6, 7) und *E.coli* AB1157 (Spur 8) ein deutliches Signal. Ein zusätzliches Signal im 2 kb-Bereich ist bei allen 3 Mu-Mutanten, jedoch nicht bei *E.coli* AB1157 zu verzeichnen.

3) Hydrolyse mit *Dra*I:

Gleich starke Signale bei etwa 3 kb beobachtet man sowohl bei den Mu-Mutanten (Spur 9, 10, 11) als auch bei *E.coli* AB1157 (Spur 12). Zusätzlich erscheint bei allen 4 Proben ein schwaches Signal bei

etwa 10 kb. Weitere Signale bei den Mu-Mutanten sieht man bei 1.6 und 0.6 kb.

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, bleibt festzustellen, daß bei der Hybridisierung gegen das Rifampicin-Resistenzgen $3d^{rif}$ die Mu-Mutanten und der *E.coli* Wildtyp AB1157 dasselbe Hybridisierungsmuster zeigen. Dennoch fällt auf, daß alle 3 Mu-Mutanten noch zusätzliche Signale schwacher Intensität zeigen, die bei *E.coli* AB1157 nicht erscheinen und wohl Mu- oder Stamm-spezifischer Natur sind.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß es sich bei Genort Rif^M und dem des Rifampicin-Resistenzgens $3d^{rif}$ nicht um denselben handelt. Wäre es gleich, würde man, wegen der Insertion des Phagen Mu in den dem $3d^{rif}$ -Gen homologen Bereich, ein zwischen den Mu-Mutanten und dem *E.coli* AB1157 unterschiedliches Hybridisierungsmuster erwarten. Denn bei einer Insertion in den dem $3d^{rif}$ -Gen homologen Bereich dürfte z.B. bei der *EcoRI*-Verdauung das 9kb-Fragment bei den Mu-Mutanten nicht mehr erscheinen, sondern müßte als zweifaches Signal unterschiedlicher Größe zu sehen sein. Diese Argumentation kann analogerweise für die *BamHI*- und *DraI*-Verdauung fortgesetzt werden.

Die Tatsache, daß alle 3 Mu-Mutanten Rif^{M1} , M3 und M4 ein völlig identisches Hybridisierungsmuster aufweisen, bestärken meine Vermutung, daß bei allen 3 Mu-Mutanten die Mu-Integration im gleichen DNA-Bereich stattgefunden hat und diese somit identisch sind. Doch wegen der oben diskutierten, möglichen unvollständigen Integration des Phagen Mu wird die Interpretation erschwert und läßt keine abschließende Wertung zu. Die endgültige Beantwortung der Frage nach einem möglichen gleichen Genort von Rif^M und $3d^{rif}$ müßte durch weitere Southernblot-Analysen unter Verwendung anderer Enzymkombi-

nationen angestrengt werden, wobei sukzessive das β -Lactamasegen, das 3d^{rif}-Gen und die Mu cIts Ap-DNA als Probe eingesetzt werden sollten. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Klonierung der Mu-Integrationsstellen.

4.8. KLONIERUNG EINES RNA POLYMERASE-ABHÄNGIGEN RIFAMPICIN-RESISTENZGENS

Im Zusammenhang mit der Suche nach *rpoB* unabhängigen Rifampicin-Resistenzgenen und der Frage nach einem möglichen gemeinsamen Genort aller Resistenzgene von *rpoB* unabhängigen Permeabilitätsmutanten interessierte, ob alle von Tropschug (1981) durch Nitrosoguanidin-Behandlung erzeugten und als Rifampicinaufnahmemutanten definierten *E.coli* Stämme einer einheitlichen Resistenzklasse angehören, deren Resistenzursache also auf Mutationen am gleichen Genort zurückzuführen ist. Im folgenden experimentellen Ansatz sollte untersucht werden, ob das aus der Rifampicinaufnahmemutante 10/lt klonierte Resistenzgen 3d^{rif} mit den Resistenzgenen anderer Rifampicinaufnahmemutanten nicht nur im phänotypischen Verhalten gegenüber Rifampicin, sondern auch auf DNA-Ebene homolog ist. Ein Weg zur Beantwortung dieser Fragen führt über die Klonierung des Resistenzgens aus diesen Mutanten und anschließende Vergleichsstudien. Als Ausgangsstamm für die Klonierung eines weiteren *rif^r*-Gens wurde die von Tropschug (1981) als Rifampicin-resistente Aufnahmemutante 7/3 gewählt, deren RNA-Polymerase jedoch Wildtypsensitivität besitzt (Tropschug *et al.*, 1981). Die minimale Hemmkonzentration an Rifampicin wurde in dieser Arbeit zu 40 µg/ml bestimmt. Es sei an dieser Stelle betont, daß die eben beschriebenen Eigenschaften des Stammes 7/3 durch eigene Arbeiten nicht nachgeprüft wurden und daß dessen genomische DNA aus einer in rifampicinfreiem Medium hochgezogenen Kultur isoliert wurde.

4.8.1. Erstellung einer Genbank aus der Rifampicin-resistenten Mutante 7/3 im Vektor pUC12

Für die Etablierung einer Genbank notwendigen Voraussetzungen gelten die in Kap. 4.2.1. angestellten Überlegungen. Zur Überprüfung der Rifampicinresistenz der Mutante 7/3 wurden aus der Glycerinkultur im Strichtest Zellen auf rifampicinfreies und rifampicinhaltiges (40 µg/ml) LB-Medium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Bebrütung zeigte sich auf beiden Platten gleichförmiges Wachstum. Um nicht Gefahr zu laufen, die DNA aus möglichen *rpoB* Spontanmutanten zu isolieren, wurde zur Gewinnung dieser das rifampicinfreie LB-Kulturmedium mit einer Kolonie von der rifampicinfreien Agarplatte beimpft und daraus die für die Klonierung eingesetzte genomische DNA isoliert.

Die chromosomale DNA der Mutante 7/3 wurde nach der im Methodenteil beschriebenen Verfahren (3.3.1) isoliert und 250 µg davon mit *Hae*III (GG↓CC) partiell gespalten. Das dabei erhaltene DNA-Fragmentgemisch wurde über ein 0.8%iges Agarosegel aufgetrennt und die DNA im Bereich zwischen 3000 und 6000 bp durch Elektroelution (3.3.7) isoliert. Die so gewonnene chromosomale DNA wurde im molaren Verhältnis von etwa 2.5:1 (Vektor:Insert) in den mit *Sma*I (CCC↓GGG) vollständig linearisierten und alkalischer Phosphatase behandelten Vektor pUC12 ligiert und in kompetente JM83-Zellen transformiert. Je 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf ampicillin- (100 µg/ml) und XGal- (2%) haltige LB-Agarplatten ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Dabei

wurden 11750 weiße (95%) und 620 blaue Kolonien (5%) erhalten. Mit dieser Anzahl an rekombinanten (weißen) Klonen war die statistische Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Repräsentierung des Genoms der Mutanten $7/3$ in dieser Genbank erfüllt. Denn setzt man die in diesem Experiment verwendeten Fragmentgrößen (3-6 kb) in die bereits in Kap. 4.2.1. besprochene Formel von Clarke und Carbon (1976) ein, so ist im Falle von 3 kb-Fragmenten mit 5670 Kolonien und im Falle von 6 kb-Fragmenten mit 2834 Kolonien eine 99%ige Wahrscheinlichkeit gegeben, eine bestimmte DNA-Sequenz in dieser Genbank zu finden. Die Komplexität der Genbank wurde dadurch überprüft, daß 20 Klone willkürlich herausgesucht wurden und von jedem im Schnellverfahren die Plasmid-DNA isoliert wurde. Die Größe der Insertionen wurde durch Hydrolyse der jeweiligen Plasmid-DNA mit *EcoRI*/*HindIII* (flankieren die Klonierungsstellen im 5'-bzw. 3'-Bereich) und anschließender elektrophoretischen Auftrennung der Spaltprodukte im Agarosegel bestimmt. Die erhaltenen Fragmentgrößen variierten erwartungsgemäß zwischen 3 und 6kb (nicht gezeigt). Die Hydrolyse dieser Plasmid-DNAs mit einem Enzym mit 4bp-Erkennungssequenz (*HaeIII*) führte in jedem Falle zu einem eigenen Spaltmuster (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß jeder Klon eine ihm eigene Insertion unterschiedlicher Herkunft enthält.

4.8.2. Selektion auf Rifampicin-resistente Klone

Die Selektion Rifampicin-resistenter Klone wurde nach dem bereits in Kap. 4.2.2. praktizierten Verfahren durchgeführt. Etwa 5000 der oben erhaltenen rekombinanten Klone wurden zur Selektion in einem

definierten Raster auf LB-Agarplatten, die verschiedene Antibiotika enthielten, überimpft:

- a) auf Platten mit Ampicillin (100 µg/ml)
- b) auf Platten mit Ampicillin (50 µg/ml) + Rifampicin (40 µg/ml)

Die beimpften Agarplatten wurden verschieden lange Zeiten bei 37°C inkubiert. Die lediglich Ampicillin enthaltende "Masterplatten" wurden 8 und die beide Antibiotika enthaltende Selektionsplatten 16 Stunden lang bei 37°C belassen. Nach insgesamt 12 Stunden Inkubationszeit waren auf den Selektionsplatten zwei deutlich gewachsene Kolonien (a und b) zu sehen, deren Zahl sich nach 16stündiger Inkubation auf 9 erhöhte (c,d,e,f,g,h,i). Um bei diesen Klonen zunächst einmal zwischen plasmidunabhängigen *rpoB* Spontanmutanten und plasmidabhängigen *rif^r* Mutanten unterscheiden zu können, wurden die 9 Klone von der rifampicinfreien "Masterplate" zum einen auf ampicillinhaltige (100 µg/ml), zum zweiten auf ampicillin- (50 µg/ml) + rifampicinhaltige (40 µg/ml) Agarplatten überimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Alle 9 Kolonien sind auf ampicillinhaltigem Medium sehr gut angewachsen. Auf rifampicinhaltigem Medium sind jedoch lediglich noch 2 Klone (f und i) wieder angegangen. Zur weiteren Untersuchung wurden diese beiden Klone von der Ampicillinplatte weg in ein ampicillin- (50 µg/ml) + rifampicinhaltiges (40 µg/ml) Flüssigmedium überimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Unter diesen Bedingungen wurde nur noch bei Klon f deutliches Wachstum beobachtet, so daß zumindest dessen Rifampicinresistenz als plasmidkodiert angesehen werden konnte. Die Insertion von Klon f wurde durch Hydrolyse mit *Bam*HI/*Sac*I und elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel zu etwa 6 kb bestimmt (vgl. Fig. 40). Da bei Klon f in Wiederholungsversuchen eindeutig eine plasmidkodierte Rifampicinresistenz festgestellt werden konn-

te, wurde für die weiteren Untersuchungen nur noch dieser, im folgenden als $rpoB^{rif}$ bezeichneter Klon verwendet.

4.8.3. Charakterisierung von Klon $rpoB^{rif}$

- Wachstumsverhalten gegenüber Rifampicin

Ein wichtiges Kriterium für eine plasmidkodierte Rifampicin-Resistenz ist dann erfüllt, wenn der transformierte und anschließend auf Rifampicin selektionierte rekombinante, Plasmid-haltige Klon eine phänotypische Resistenz zeigt, die sich in beliebig oft wiederholbaren Versuchen bestätigen läßt. Um der Frage nachzugehen, ob diese Bedingung auch bei Klon $rpoB^{rif}$ erfüllt ist, wurde dessen Plasmid-DNA in kompetente JM83-Zellen transformiert und der Transformationsansatz zunächst auf ampicillinhaltige (100 µg/ml) LB-Platten selektionierte. Einzelkolonien wurden anschließend in 50 ml LB-Medium konstanter Ampicillin- (50 µg/ml), jedoch steigender Rifampicinkonzentration (0-120 µg/ml) überimpft und verschieden lange Zeiten bei 37°C geschüttelt. Zur Kontrolle wurde mit dem Wildtypplasmid pUC12/JM83 in der gleichen Weise verfahren. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tab. 20 zusammengestellt: nach 14 Stunden Inkubation verzeichnet man ein voll ausgeprägtes Wachstum bis 50 µg/ml Rifampicin, nach 24 Stunden ein deutliches Wachstum bis 80 µg/ml und nach insgesamt 36 Stunden Inkubation stellt man bis 100 µg/ml noch Wachstum in Flüssigkultur fest. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte zu keiner Steigerung der Resistenz mehr. Das zu Kontrollzwecken unter gleichen Bedingungen gehaltene Wildtypplasmid pUC12/JM83 stellte bei 10 µg/ml das Wachstum ein. In einem analogen Versuch wurden die transformierten Einzelkolonien nicht in Flüssigkultur übertragen, sondern auf LB-Agarplatten

rpoB ^{rif} in JM83 nach:	Rifampicin-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]												
	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
14 h	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
17 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
20 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
24 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
36 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
pUC12 in JM83 nach:													
14 h	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36 h	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 20: Wachstumsverhalten von Klon rpoB^{rif} in Gegenwart unterschiedlicher Rifampicinkonzentration

Das Plasmid von Klon rpoB^{rif} wurde in kompetente JM83 Zellen transformiert und auf ampicillinhaltige (100 $\mu\text{g/ml}$) Agarplatten ausplattiert. Einzelkolonien davon wurden in je 50 ml LB-Medium mit konstanter Ampicillin- (50 $\mu\text{g/ml}$), jedoch steigender Rifampicinkonzentration (5-120 $\mu\text{g/ml}$) überimpft und insgesamt 36 Stunden bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Der Trübungszustand der Kulturen wurde in den oben angegebenen Zeitabständen bei A₆₀₀ gemessen. In gleicher Weise wurde mit dem Wildtypplasmid pUC12/JM83 verfahren.

+ = leichte Trübung (A₆₀₀=0.2-0.4)

++ = starke Trübung (A₆₀₀=0.4-1.0)

+++ = log- bis stationäre Phase (A₆₀₀=1.0-1.8)

- = kein Wachstum

mit steigender Rifampicinkonzentration (5-120 $\mu\text{g/ml}$) überimpft und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Das hierbei erreichte Ergebnis bestätigte die bereits vorher erhaltenen Daten. Nach 24stündiger Inkubation war bis zu einer Konzentration von 80 $\mu\text{g/ml}$ Wachstum zu verzeichnen. Das in gleicher Weise behandelte Plasmid pUC12/JM83 zeigte nur bis zu einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ deutliches Wachstum.

Die bereits bei Klon 3d^{rif} gemachte Erfahrung, daß eine direkte Plattierung des Transformationsansatzes auf rifampicinhaltiges Medium zu keinem Wachstum von Kolonien führt, fand bei Klon rpoB^{rif} eine Bestätigung.

In einem anderen Versuch wurde untersucht, ob nach Ausstreichen gleicher Zellzahlen zum einen auf ampicillin-, zum anderen auf ampicillin- + rifampicinhaltige Agarplatten sich Unterschiede in der Anwachsrate ("efficiency of plating") ergeben. So wurde ein ampicillinhaltiges (100 $\mu\text{g/ml}$) LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{550} = 0.5$ ($\approx 5 \times 10^7$ Zellen/ml) wachsen gelassen. Die Zellsuspension wurde 10^{-4} verdünnt und davon wurden je 0.1 ml auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) und auf LB-Platten mit Ampicillin (50 $\mu\text{g/ml}$) + Rifampicin (80 $\mu\text{g/ml}$) ausgestrichen. Nach 16stündiger Inkubation bei 37°C waren auf der lediglich Ampicillin enthaltenden Platte 620 (100%), auf der Platte mit beiden Antibiotika dagegen nur 250 Kolonien (40%) zu finden. Derselbe Versuch, durchgeführt bei einer niedrigeren Rifampicinkonzentration (60 und 30 $\mu\text{g/ml}$), führte zu einem etwas anderen Zahlenverhältnis: bei 60 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin waren 400 Kolonien (65%), bei 30 $\mu\text{g/ml}$ aber 500 Kolonien (80%) zu zählen. Das wieder als Kontrolle dienenden Wildtypplasmid pUC12/JM83 zeigte auf der rifampicinhaltigen Agarplatte erwartungsgemäß keinerlei Wachstum.

Zur genauen Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration an Rifampicin wurde je 1 μ l einer im ampicillinhaltigem LB-Medium (100 μ g/ml) gewachsenen Übernachtskultur von Klon *rpoB^{rif}* auf LB-Agarplatten mit konstanter Ampicillin- (50 μ g/ml), jedoch steigender Rifampicinkonzentration (5-120 μ g/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die dabei ermittelte minimale Hemmkonzentration wurde zu 100 μ g/ml bestimmt. Klon *rpoB^{rif}* kann somit als hochresistent gegenüber Rifampicin eingestuft werden.

Die Ergebnisse obig besprochener Versuche weisen alle in eine Richtung, nämlich in die, daß eine Erhöhung der Rifampicinkonzentration ein verzögertes Wachstum des Klons *rpoB^{rif}* zur Folge hat. Diese offenbar von der Rifampicinkonzentration abhängige Wachstumsgeschwindigkeit wurde auch bei den Wachstumskurven (Fig. 36) unter verschiedenen Antibiotikakonzentrationen bestätigt: bei einer Rifampicinkonzentration von 10 μ g/ml findet man fast dasselbe Wachstumsverhalten wie unter rifampicinfreien Kulturbedingungen. Bei einer Konzentration von 40 μ g/ml ist ein deutlich reduziertes Wachstum zu verzeichnen. Die stationäre Phase wird hier erst etwa 5 Stunden später als bei der rifampicinfreien Anzucht erreicht. Bei 80 μ g/ml ist das Wachstum noch stärker verlangsamt und man beobachtet sogar 2 1/2 Stunden nach Zugabe des Antibiotikums eine 2stündige lag-Phase, ehe wieder ein Wachstum festzustellen ist. Die stationäre Phase wird bei dieser Rifampicinkonzentration erst 10 Stunden später erreicht.

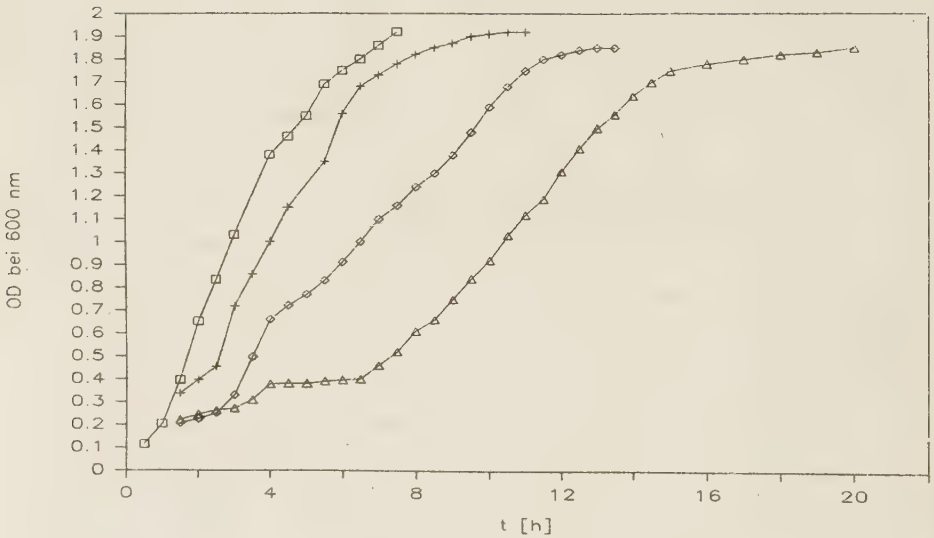


Fig. 36: Wachstumskurven von Klon $rpoB^{rif}$ in Gegenwart unterschiedlicher Rifampicinkonzentration

Wachstumskurven von Klon $rpoB^{rif}$ wurden in LB-Medium bei konstanter Ampicillin- (50 µg/ml), jedoch steigender Rifampicinkonzentration (0-80 µg/ml) gemessen (vgl. 3.1.6.). Bei einer $OD_{600nm}=0.25$ (durch Pfeil gekennzeichnet), wurde aus einer Stammlösung von 10 mg/ml Rifampicin in unterschiedlicher Menge zugegeben.

□ = 0 µg/ml += 10 µg/ml ◇ = 40 µg/ml △ = 80 µg/ml

- Hybridisierung des $rpoB^{rif}$ -Gens an andere Rifampicin-Resistenzgene im Southernblot

Zur Klärung der Frage, ob der Rifampicin-resistente Klon $rpoB^{rif}$ neben dieser Eigenschaft der plasmidkodierten Resistenz auch auf der DNA-Ebene Ähnlichkeiten zu Klon $3d^{rif}$ oder gar zu den in Kap.4.7 besprochenen Mu-Mutanten aufweist, wurde eine Southernblot-Analyse durchgeführt: Die genomische DNA der Mu-Mutanten RifM1, RifM3 und RifM4 (Kollenda *et al.*, 1986) sowie die DNA aus *E.coli* AB1157 wurde in Parallelansätzen mit *Bam*HI, *Eco*RI oder *Dra*I vollständig verdaut und anschließend in einem 0.7%igen Agarosegel aufgetrennt (Fig. 37). Zusätzlich wurde das aus dem Klon $3d^{rif}$ isolierte *Bam*HI-Insert (2.15 kb) und das daraus erhaltene 0.66 kb große *Bam*HI/*Dra*I-Fragment auf dasselbe Gel aufgetragen (Fig. 37). Nach erfolgtem Transfer der DNA auf Nitrocellulosefilter wurde diese sukzessive gegen [32 P] nicktranslatierter DNA von $3d^{rif}$ (in pUC12), pUC12 und $rpoB^{rif}$ hybridisiert, wobei das Filter nach jeder Hybridisierung unter stringenten Bedingungen gewaschen wurde (vgl. 3.5.4.). Die Autoradiographie der einzelnen Hybridisierungsansätze (Fig. 37) führte zu folgenden Resultaten:

1. pUC12 DNA als Probe:

Die DNA der Mu-Mutanten (Spur 1-3, 5-7, 9-11), welche auch das Ap^r -Gen inseriert haben, hybridisieren erwartungsgemäß mit dem Ap^r -Gen von pUC12 (vgl. auch Besprechung in Kap.4.7). Die DNA von *E.coli* AB1157 (Spur 4, 8, 12) zeigt, ebenso wie die beiden Fragmente von $3d^{rif}$ (Spur 13), kein Signal.

2. DNA von $3d^{rif}$ (in pUC12) als Probe:

Neben den bereits unter 1) erwähnten Ap^r -DNA-spezifischen Banden der Mu-Mutanten findet man in allen Ansätzen (Spur 1-13) zusätz-

liche Signale, die auf eine Hybridisierung mit der DNA des 3d^{rif}-Gens zurückzuführen sind. Die dem 3d^{rif}-Gen entstammenden Fragmente zeigen die erwartete starke Hybridisierung (Spur 13).

3. DNA von rpoB^{rif} (in pUC12) als Probe:

Auch hier findet man wieder die *Ap^r*-spezifischen Signale der Mu-Mutanten (Spur 1-3, 5-7, 9-11). Die anderen Banden gehen auf Hybridisierungen mit der DNA des rpoB^{rif}-Gens zurück, wobei erwartungsgemäß kein Unterschied zwischen den Signalen der Mu-Mutanten von *E.coli* AB1157 auszumachen ist. Die DNA-Fragmente aus dem 3d^{rif}-Gen zeigen jedoch keinerlei Hybridisierungssignale, so daß jegliche Homologie von 3d^{rif} mit rpoB^{rif} auf DNA-Ebene wohl auszuschließen ist.

Ein möglicher gemeinsamer Genort von rpoB^{rif} und rif^M der Mu-Mutanten (vgl. Kap. 4.7) fällt wohl außer Betracht, denn bei Annahme eines gleichen Genorts müßten sich die *Ap^r*-spezifischen Banden (vgl. auch Diskussion in Kap. 4.7) in abgeänderten Größenverhältnissen wiederfinden. Zudem zeigt die *E.coli* AB1157-DNA bei der Hybridisierung mit rpoB^{rif} dasselbe rpoB^{rif}-spezifische Bandenmuster wie die Mu-Mutanten, so daß man einen gemeinsamen Ort dieser beiden Gene wohl nicht postulieren darf.

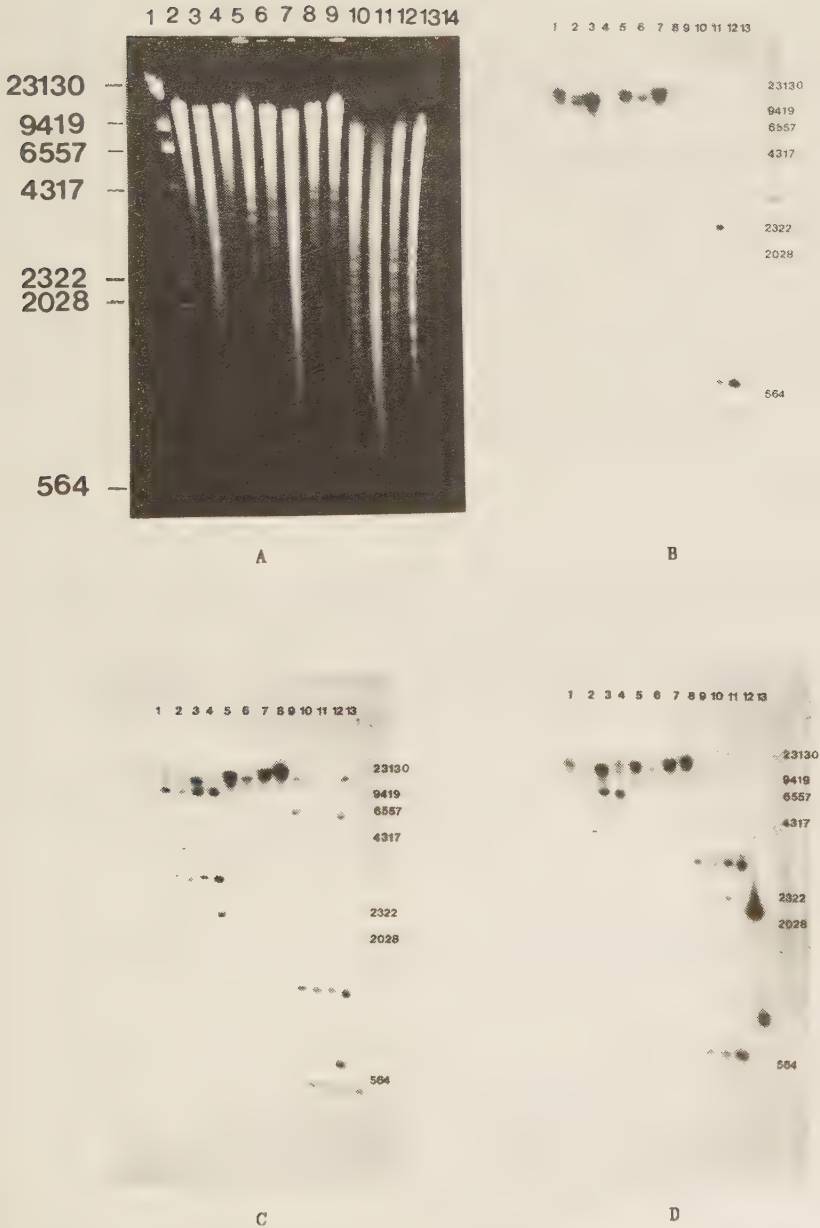


Fig. 37: Hybridisierung von pUC12-, 3drif- und rpoBrif-DNA an hydrolysierte DNA aus Mu-Mutanten und *E. coli* AB1157 nach Southern (1975)

- A) Auftrennung der zellulären DNA der Mu-Mutanten RifM1, RifM3, und RifM4, sowie des *E. coli* AB1157 in einem 0.7%igen Agarosegel nach Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen.

Spur 1: DNA-Längenstandard (Lambda-DNA, *EcoRI*/*HindIII*)

Spur 2: RifM1 (<i>EcoRI</i>)	Spur 6: RifM1 (<i>BamHI</i>)
" 3: RifM3 (")	" 7: RifM3 (")
" 4: RifM4 (")	" 8: RifM4 (")
" 5: AB1157 (")	" 9: AB1157 (")

Spur 10: RifM1 (<i>DraI</i>)	Spur 14: 3d ^{rif} -Gen (2.15kb) + das
" 11: RifM3 (")	daraus erhaltene 0.66kb
" 12: RifM4 (")	große <i>BamHI</i> / <i>DraI</i> -Fragment
" 13: AB1157 (")	

- B, C und D: Entsprechender Southernblot nach Hybridisierung und Autoradiographie. Anordnung der Spuren wie oben.

- B) pUC12
C) 3d^{rif}
D) rpoB^{rif}

Je 10 µg zelluläre DNA der Mu-Mutanten und des *E. coli* AB1157 wurden in Parallelansätzen mit den Enzymen *BamHI*, *EcoRI* und *DraI* hydrolysiert und in einem 0.7% igen Agarosegel bei einer Spannung von 3 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Der DNA-Transfer auf Nitrozellulose sowie die Hybridisierungsbedingungen wurden gemäß der Beschreibung im Methodenteil durchgeführt. Als Proben dienten die [³²P] nicktranslatierten DNAs von:

Nach jeder Hybridisierung und Autoradiographie wurden die Filter 1h bei 90°C mit Waschpuffer (vgl. Methodenteil, Kap. 3.5.4.) im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dem Trocknen des Filters bei Raumtemperatur wurde sodann mit der nächsten Probe hybridisiert.

- Partielle Sequenzierung von Klon *rpoB^{rif}*

Um eine erste Information über die DNA-Sequenz des *rpoB^{rif}*-Gens zu erhalten, wurden die beiden Enden dieses DNA-Fragments ansequenziert. Als Matrize diente das denaturierte Plasmid des Gesamtklons *rpoB^{rif}* (pUC12 mit etwa 6 kb großer *Sma*I-Insertion), wobei die Sequenzreaktion einmal mit dem Universal-, ein anderes Mal mit dem Reversen Primer gestartet wurde. Bei der mit dem Universalprimer gestarteten Sequenzreaktion wurde folgende Nukleotidabfolge ermittelt (vgl auch Fig. 43):

10	20	30	40	50	60
GGCCTCCGTC	GAAGACCGCA	GGAGTTTCGC	AAGAACTTA	ATCCCCTGCG	TAGACGGTGA
70	80	90	100	110	120
CAGAACGCTA	AGATTAAATC	TTTTATATTC	TGGCTTGTTT	CTGCTCACCG	TAATTAAGAC
130	140	150	160	170	180
GCTCTCTCCG	TTTGGAGGAG	TGAAGTGAGT	TCCAGAGATT	TTCTCTGGCA	AACATCCAGG
190	200	210	220	230	240
AGCAAAGCTA	ATGGCTTTAA	ATCTTCAAGA	CAAACAAGCG	ATTGTTGCTG	AAGTGAGCGA
250	260	270			
AGTAGCCAAA	GGCGCGCTGT	CTGCAGTAGT			

Fig. 38: Nukleotidsequenz eines Endes der Insertion von Klon *rpoB^{rif}*

Diese Sequenz wurde unter Verwendung eines Computerprogrammes (Beckman: Microgenie) in der gleichnamigen Genbank nach Homologien mit bekannten Nukleotidsequenzen abgesucht. Das Ergebnis war zwar überraschend, jedoch eindeutig: die ermittelte Sequenz war

identisch mit einem Bereich des Genclusters *rplK*, *rplA*, *pplJ*, *rpoB* und *rpoC* (vgl. Fig. 39). Die Homologie beginnt bei Position 1532 im intergenischen Bereich des *rplA*- und *pplJ*-Teils und erstreckt sich stromaufwärts in Transkriptionsrichtung. Dieser Befund machte die Annahme, daß die gefundene Rifampicin-Resistenz von Klon *rpoB*^{Rif} von einer Mutation im *rpoB*-Locus abhängig ist, sehr wahrscheinlich.

Die durch Sequenzierung mit dem Reverse-Primer ermittelte Sequenz von ca. 200 bp wurde ebenfalls einer Computeranalyse unterzogen, wobei weder Homologien zum *rpoB*-Operon noch zu anderen bekannten Genen innerhalb der Microgenie-Genbank gefunden werden konnten. Aus diesen Daten ist zu schließen, daß neben einem Bereich aus dem *rpoB*-Operon noch zusätzliche bakterielle DNA unbekannter Herkunft kloniert wurde (vgl. Diskussionsteil). Eine weitere Aufgabe bestand nun darin, den Anteil dieser beiden Bereiche innerhalb des klonierten Fragments genauer zu bestimmen.

- Restriktionskartierung von Klon $rpoB^{rif}$

In Kenntnis der Restriktionskarte des *rpoB*-Operons (Ovchinnikov *et al.* 1982, Ovchinnikov *et al.* 1982, Post *et al.* 1979) ist eine genauere Lokalisierung der Homologie des klonierten Resistenzgens mit dem *rpoB*-Operon durch Hydrolyse mit geeigneten Restriktionsenzymen unschwer durchzuführen. Da die Länge der Insertion von Klon $rpoB^{rif}$ etwa 6 kb beträgt und die Sequenzierung eines Fragmentendes eine Homologie mit dem *rpoB*-Operon ab Position 1514 aufzeigte, würde man eine Fortsetzung dieser Homologie bis etwa Base 7500 erwarten. Dieser angenommene Bereich umfaßt das *rplJ*-, *rplL*- und *rpoB*-Gen (Fig. 39).

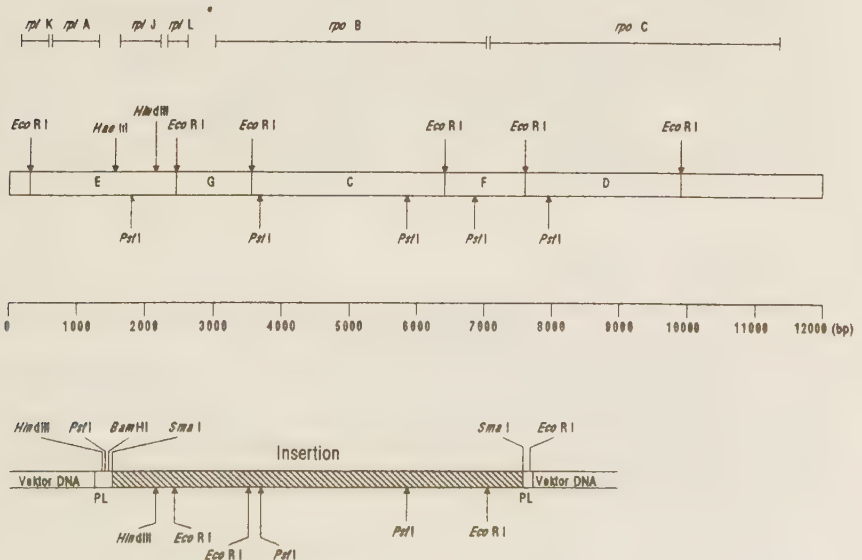


Fig. 39: Restriktionskarte des *rpoB*-Operons aus *E. coli* und der DNA von Klon $rpoB^{rif}$

Eine Hydrolyse des Klons mit in diesem Bereich vorkommenden Erkennungsstellen von Restriktionsenzymen sollte ein dieser Region des *rpoB*-Operons entsprechendes Fragmentmuster ergeben. So wurde in Anlehnung an die Restriktionskarte des *rpoB*-Operons die Plasmid-DNA des Klons *rpoB*^{rif} mit folgenden Enzymen bzw. Enzymkombinationen gespalten:

1. Hydrolyse mit *EcoRI*:

Zu erwarten ist das *EcoRI*-G- (1.08 kb) und das *EcoRI*-C-Fragment (2.87 kb) sowie ein Teil des *EcoRI*-E- bzw. *EcoRI*-F-Segments (vgl. Fig. 39). Im Spaltmuster der Fig. 40 findet man eine 1.08 kb- (= *EcoRI*-G-Segment), eine 0.56 kb- (= partielles *EcoRI*-F-Segment, entstanden durch Hydrolyse der *EcoRI*-Stelle des F-Segments und der des Polylinkers) und eine 3.5 kb-Bande (setzt sich zusammen aus dem 2.6 kb großen Vektoranteil und dem 0.9 kb großen, partiellen *EcoRI*-E-Segment, welches sich von der *SmaI*-Klonierungsstelle bis zur ersten *EcoRI*-Stelle der Insertion erstreckt). Das erwartete, 2.87 kb große *EcoRI*-C-Fragment erscheint nicht, dafür eine um 0.5 kb größere 3.35 kb-Bande.

2. Hydrolyse mit *BamHI*:

Im gesamten *rpoB* Operon befindet sich keine einzige *BamHI*-Stelle, sondern nur eine innerhalb des Polylinkers, so daß bei der Hydrolyse mit *BamHI* lediglich eine Linearisierung des Plasmids erfolgen sollte. Genau dieses beobachtet man auch, nämlich eine einzelne Bande in der Größenordnung von etwa 8.6 kb.

3. Hydrolyse mit *HindIII*:

Im Bereich des *rpoB* Operon liegt an Pos. 2153 eine *HindIII*-Stelle. Das bedeutet, daß bei Spaltung des Plasmids mit *HindIII* wegen der zusätzlichen *HindIII*-Stelle im Polylinker (vgl. Fig. 39) ein 0.62

kb und ein etwa 8 kb großes Fragment entstehen muß. Das Vorhandensein dieser beiden Fragmente wurde bestätigt (Fig. 40).

4. Hydrolyse mit *Pst*I:

Das *rpoB* Operon als ganzes enthält 5 *Pst*I-Stellen, von denen sich 4 im klonierten Teil wiederfinden sollten (Fig. 39). Spaltet man mit *Pst*I, sollten sich die - *Pst*I-Stelle des Polylinkers mit einbezogen - Fragmente mit der Länge von 0.26 kb (*Pst*I-Stelle des Polylinkers + *Pst*I-Stelle (1) der Insertion), 1.89 kb (*Pst*I-Stelle des E-Segments + *Pst*I-Stelle (1) des C-Segments), 2.18 kb (*Pst*I-Fragment des C-Segments), 0.97 kb (*Pst*I-Fragment zwischen C- und F-Segment) und von 3.3 kb (setzt sich zusammen aus dem 2.6 kb großen Vektoranteil und dem *Pst*I-*Sma*I-Fragment des F-Segments). Tatsächlich erhält man ein 0.28, 1.89, 2.18 und ein 4.2 kb-Fragment. Das Erscheinen dieses 4.2 kb-Fragments ist durch Addition des 0.97 kb mit dem 3.3 kb großen Fragment erklärbar. Dies setzt jedoch voraus, daß die vierte, im F-Segment lokalisierte *Pst*I-Stelle entweder nicht vorhanden ist oder sich nicht schneiden läßt.

5. Hydrolyse mit *Eco*RI/*Bam*HI:

Bei Verwendung dieser Enzymkombination wird der Vektoranteil exakt vom Insertionsanteil abgetrennt und es sollten neben dem 2.6 kb großen Vektor-Fragment nur noch die *Eco*RI-spezifischen Fragmente entstehen (vgl. Fig. 39): nämlich das 1.08 kb große *Eco*RI-G-, das 3.5 kb große *Eco*RI-C, sowie ein 0.9 kb großes, partielles *Eco*RI-E- und ein 0.56 kb großes, partielles *Eco*RI-F-Fragment. Genau dieses Spaltmuster wurde auch erhalten (Fig. 40).

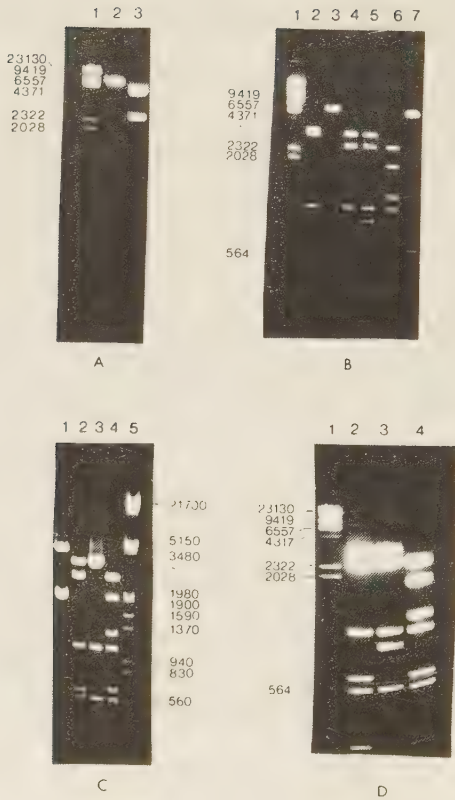


Fig. 40: Hydrolyse der Plasmid-DNA von Klon $rpoB^{rif}$ mit verschiedenen Restriktionsenzymen

Die Plasmid-DNA von Klon $rpoB^{rif}$ wurde mit den angegebenen Enzymen gespalten und über ein 1%-Agarosegel aufgetrennt.

A) Spur 1: Lambda-DNA/HindIII
" 2: BamHI
" 3: BamHI/SacI

B) Spur 1: Lambda-DNA/HindIII
" 2: EcoRI
" 3: BamHI
" 4: EcoRI/HindIII
" 5: EcoRI/BamHI
" 6: EcoRI/PstI
" 7: HindIII

C) Spur 1: PstI
" 2: EcoRI/HindIII
" 3: EcoRI
" 4: EcoRI/PstI
" 5: Lambda-DNA/HindIII

D) Spur 1: Lambda-DNA/HindIII
" 2: EcoRI/HindIII
" 3: EcoRI/BamHI
" 4: EcoRI/PstI

6. Hydrolyse mit *EcoRI*/*HindIII*:

Auch bei dieser Enzymkombination wird der Vektor wieder exakt von der Insertion abgetrennt (vgl. Fig. 39, 40) und man erwartet fast dasselbe Spaltmuster wie bei der *EcoRI*/*BamHI*-Hydrolyse, nur mit dem Unterschied, daß das 0.9 kb große, partielle *EcoRI*-E-Segment wegen der darin gelegenen *HindIII*-Stelle in ein 0.6- und 0.3 kb großes Fragment gespalten wird. Die in Fig. 40 auftretenden Banden bestätigen das geforderte Spaltmuster.

7. Hydrolyse mit *EcoRI*/*PstI*:

Setzt man diese Enzymkombination ein, wird ebenfalls der Vektoranteil von der Insertion abgetrennt und man sollte - das unter Punkt 3 diskutierte Fehlen der vierten *PstI*-Stelle vorausgesetzt - folgende Fragmente erhalten: ein 2.6 kb großes Vektorfragment, ein 2.18 kb Fragment (erzeugt durch die beiden im C-Segment befindlichen *PstI*-Stellen), ein 1.2 kb Fragment (entstand durch die zweite, im C-Segment befindliche *PstI*- und durch die davon 3'-stromabwärts gelegene *EcoRI*-Stelle), ein 1.08 kb Fragment (das *EcoRI*-G-Segment), ein 0.66 kb-Fragment (das *PstI*/*EcoRI*-Fragment aus dem G-Segment), ein 0.56 kb Fragment (partiellies F-Segment, entstanden durch Hydrolyse des am 3'-Ende der Insertion gelegenen *EcoRI*-Stelle und des Polylinkers) und ein 0.15 kb Fragment (das sich dem G-Segment in 3'-Richtung anschließende *EcoRI*/*PstI*-Fragment).

Die korrekte Zuordnung der durch Restriktionsanalyse entstandenen Banden wurde durch Southernblot-Hybridisierung überprüft. Die mit den Enzymkombinationen *EcoRI*/*HindIII*, *EcoRI*/*PstI* und *EcoRI*/*BamHI* gespaltene DNA *rpoBr^{if}* Klons wurde im Agarosegel aufgetrennt und die DNA auf Nitrozellulosefilter übertragen. Der Filter wurde zunächst gegen die [³²P]-nicktranslatierte DNA des *rpoBr^{if}* Plasmids,

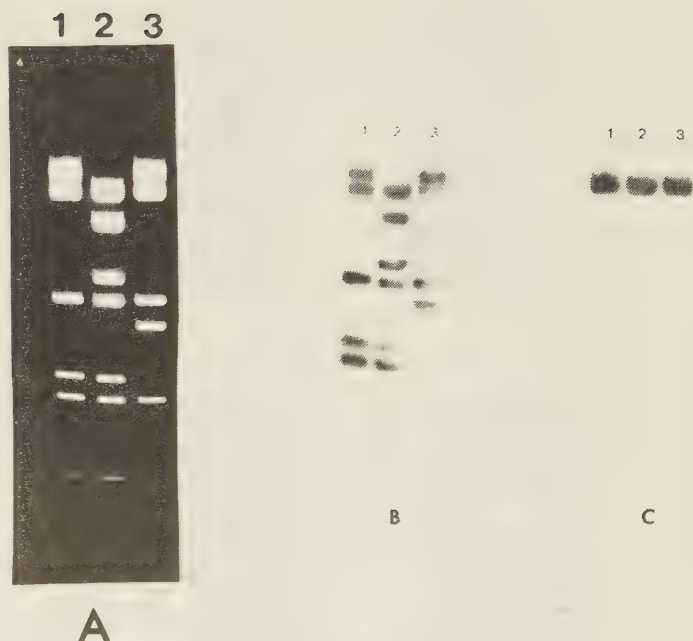


Fig. 41: Hydrolyse der Plasmid-DNA von Klon $rpoB^{rif}$ mit verschiedenen Restriktionsenzymen und anschließender Hybridisierung an die [^{32}P] nicktranslatierte Plasmid-DNA von Klon $rpoB^{rif}$ bzw. an die pUC12-DNA

A) Auftrennung der Plasmid-DNA von Klon $rpoB^{rif}$ in einem 0.8% Agarosegel nach Spaltung mit folgenden Enzymen:

Spur 1: *EcoRI/HindIII* Spur 2: *EcoRI/PstI* Spur 3: *EcoRI/BamHI*

B) Entsprechender Southernblot nach Hybridisierung mit der Plasmid-DNA von Klon $rpoB^{rif}$

C) Entsprechender Southernblot nach Hybridisierung mit pUC12-DNA

Je 2 μg der Plasmid-DNA von Klon $rpoB^{rif}$ wurde in Parallelansätzen mit den oben angegebenen Enzymkombinationen gespalten und in einem 0.8% Agarosegel aufgetrennt (A). Der DNA-Transfer auf Nitrozellulose-Filter und die Durchführung der Hybridisierung erfolgte gemäß der Beschreibung im Methodenteil (Kap. 3.5.). Als Proben wurden die [^{32}P] nicktranslatierten DNAs von Klon $rpoB^{rif}$ (B) und von pUC12 (C) verwendet. Nach der Hybridisierung mit der ersten Probe (B) wurde der Filter durch stringentes Waschen (Kap. 3.5.4.) von der hybridisierten DNA befreit und anschließend gegen die nächste Probe hybridisiert.

dann gegen die [^{32}P]-nicktranslatierte DNA des Wildtypplasmids pUC12 hybridisiert. Das Autoradiogramm mit dem Plasmid des Klons *rpoB^{rif}* als Probe zeigt dasselbe Bandenmuster wie das entsprechende Agarosegel (Fig. 41). Beim Vergleich beider Autoradiogramme zeigt sich im Blot der pUC12-Hybridisierung in allen drei Spuren ein auf gleicher Höhe befindliches Signal, welches dem Vektoranteil zuzuordnen ist. Das in der Spur der *EcoRI/HindIII*-Verdauung auftretende zusätzliche Signal entspricht dem 0.62 kb großen *HindIII/HindIII*-Fragment. Das Signal kommt dadurch zustande, daß dieses Fragment etwa 30 bp Vektoranteil aufweist und somit noch Homologie mit der Probe hat (vgl. Fig. 39). Das Ergebnis dieses Experiments bestätigt die oben durch Restriktionsanalyse vorgenommene Zuordnung der Banden.

Bei zusammenfassender Betrachtung der Restriktionskartierung ist festzustellen, daß das etwa 6 kb große Fragment des *rpoB^{rif}*-Klons das gesamte *rplJ*- und *rplL*-Gen umfaßt. Was das *rpoB*-Gen betrifft, stimmt das erhaltene Restriktionsmuster bis einschließlich der zweiten *PstI*-Stelle im C-Segment völlig mit dem des vorgegebenen *rpoB* Operons überein. Da das 3'Ende der Insertion einer bakteriellen DNA nicht zuzuordnender Herkunft (vgl. Diskussionsteil) entspricht, ist mit diesem Versuch eine genaue Abgrenzung des *rpoB* Operon-Bereichs von dem des unbekannten bakteriellen Anteils ohne vollständige Sequenzierung nicht möglich.

- Identifizierung des Mutationsortes innerhalb des *rpoB^{rif}*-Gens durch Sequenzanalyse

Alle bislang analysierten Mutationen, die in *E.coli* zur Resistenz gegenüber Rifampicin führen, liegen in zwei verschiedenen Domänen des *rpoB*-Gens (Ovchinnikov *et al.*, 1981, 1983; Lisitsyn *et al.*, 1984). Der eine Bereich, innerhalb dessen 4 verschiedenen Muta-

tionen festgestellt wurden (Ovchinnikov *et al.*, 1983) erstreckt sich von Base 1540 bis 1700 des *rpoB*-Gens, ein Bereich nahe der Mitte der β -Untereinheit, der vermutlich einen wesentlichen Teil der Rifampicin-Bindungsstelle bildet. Die andere Stelle innerhalb des *rpoB*-Gens, an der eine zur Rifampicin-Resistenz führende Mutation festgestellt wurde, liegt bei Base 517 (Basenaustausch von G-C) und betrifft die Aminosäure 146 (Lisitsyn *et al.*, 1984). Andere Mutationen, die zu einer schwachen Rifampicin-Resistenz führen (Boothroyd *et al.*, 1983) scheinen auch im Bereich der 1.Domäne zu suchen sein, jedoch liegen hierfür noch keine Sequenzdaten vor.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Ursache der Rifampicin-Resistenz des *rpoB^{Rif}*-Gens ebenfalls auf eine Mutation innerhalb dieser, sich von Base 940 bis Base 1700 erstreckende Region zurückzuführen ist, mußte dieser Bereich sequenziert werden. Zur Erzeugung geeigneter Subklone wurde zunächst aus der Plasmid-DNA von Klon *rpoB^{Rif}* das 2.18 kb große *Pst*I-Fragment, welches dem C-Segment des *rpoB*-Operons homolog ist, isoliert und dieses danach mit *Hae*III gespalten. Hierbei entstanden Fragmente der Länge von 900, 370, 280, 200, 185 und 150 bp. Gemäß der Restriktionskarte des *rpoB*-Operons deckt das 200 bp große *Hae*III-Fragment den Bereich ab, in welchem die meisten der bisher gefundenen und zur Rifampicin-Resistenz führenden Mutationsstellen lokalisiert sind. Dieses Fragment wurde aus dem Polyacrylamidgel durch Salzelution isoliert und über die *Sma*I-Stelle in pUC12 kloniert. Anschließend wurde die Nukleotidsequenz nach der Technik der Plasmidsequenzierung bestimmt (Fig.42 und 43).

Beim Vergleich der ermittelten Sequenz mit der entsprechenden Sequenz des Wildtypgens (Ovchinnikov *et al.*, 1981a) wurde an Posi-

Die Identifizierung dieser neuen Mutation hat Konsequenzen für das von Lipkin *et al.* (1984) vorgeschlagene Modell zur Aufklärung der Rifampicinwirkung auf die RNA-Synthese (vgl. Diskussionsteil).

Zum weiteren Homologieuntersuchung wurde das 300 bp große *EcoRI-HindIII*-Fragment (entspricht der Pos. 2514-2499 im E-Segment des *rpoB*-Operons) und das 150 bp große *EcoRI/PstI*-Fragment (entspricht Position 3527-3682 im *EcoRI*-C-Segment) isoliert und in pUC12 kloniert. Die anschließend durchgeführte Sequenzanalyse dieser beiden Fragmente erbrachte in jeder Position Übereinstimmung mit der Wildtypsequenz des *rpoB*-Operons (Fig.43).

Ob außerhalb der sequenzierten Regionen befindliche, zusätzliche Basenaustausche für die Ausbildung der Resistenz eventuell mitverantwortlich sind, kann zwar nicht völlig ausgeschlossen werden, ist aber wohl nicht anzunehmen, da bereits bei zwei anderen, vollständig sequenzierten *rpoB*-Mutanten (Ovchinnikov *et al.*, 1981b) gezeigt werden konnte, daß lediglich ein einziger Basenaustausch im jeweils gleichen *PstI*-Fragment des *rpoB*-Gens für die Rifampicin-Resistenz verantwortlich ist.

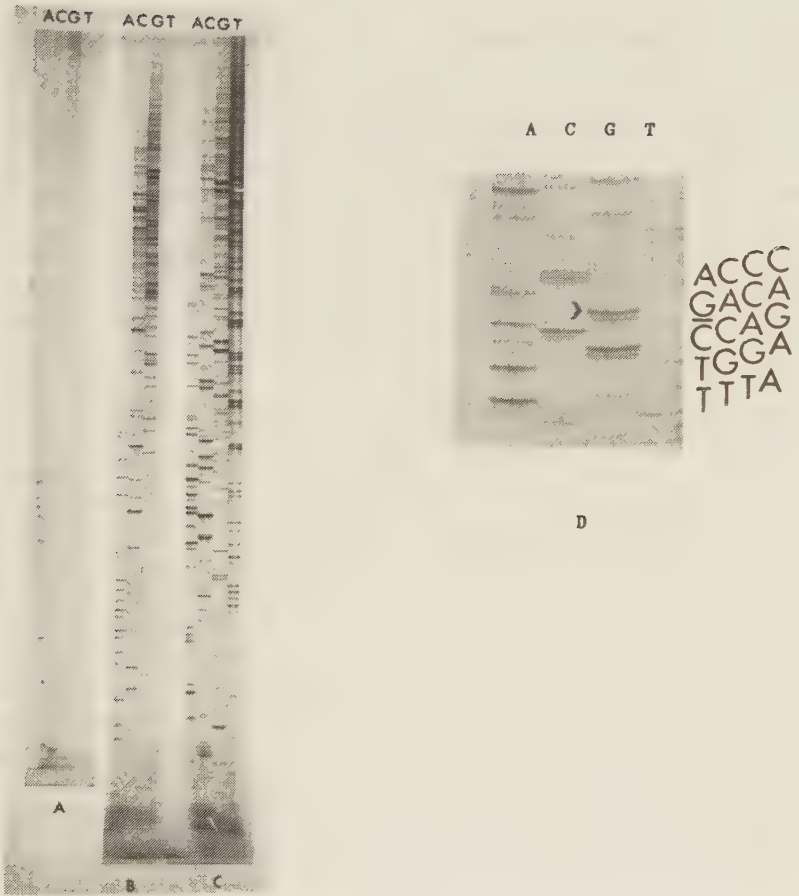


Fig. 43: Sequenzanalyse von Klon $rpoB^{rf}$

Die in dieser Abbildung gezeigten Sequenzen stellen Teilbereiche des $rpoB^{rf}$ -Gens dar, und wurden nach dem Verfahren der Plasmidsequenzierung bestimmt.

- A) $rpoB^{rf}$ -Gesamtklon, sequenziert mit Universalprimer
- B) 150 bp großes *EcoRI*/*PstI*-Fragment, sequenziert mit Reverse-Primer
- C) 200 bp großes *HaeIII*-Fragment, sequenziert mit Universalprimer
- D) Vergrößerte Darstellung des Basenaustausches von A→G im 200 bp großen *HaeIII*-Fragment.
Der Basenaustausch von A→G ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (vgl. auch Fig. 42)

5. DISKUSSION

45 Jahre sind vergangen, seit das Penicillin ein neues Zeitalter im Kampf gegen infektiöse Krankheiten einleitete. Der anfängliche Optimismus schwand, als immer mehr Bakterien eine Resistenz gegen das Antibiotikum entwickelten. Dies hatte zunächst zur Folge, daß eine intensive Suche nach anderen antibakteriellen Substanzen einsetzte. Viele der gefundenen Wirkstoffe wurden wegen ihrer Giftigkeit oder mangelnder klinischer Eignung wieder fallengelassen, andere wiederum eroberten sich neben der Penicillinfamilie einen festen Platz in der Human-Therapie. Dazu gehören das Streptomycin und andere Aminoglykoside wie Gentamycin, die Erythromycine, die Familie der Tetracycline sowie die der Rifamycine. Obgleich diese Antibiotikafamilien jeweils unterschiedliche Angriffspunkte der bakteriziden Wirkung haben (Hemmung der Zellwandbiosynthese der Bakterien, Hemmung auf Transkriptions- bzw. Translationsebene), zeichnet alle Antibiotikaklassen eine mehr oder weniger starke Anfälligkeit gegenüber Resistenzfaktoren aus, die wiederum vielfältiger Natur sein können. Einem außerordentlich großen klinischen Interesse kommt die Aufklärung der Resistenzursache zu.

Gut bekannt ist die bakterielle Resistenz gegenüber der Macrolid-Lincosamid-Streptogram B (MLS) Gruppe, die auf Translationsebene durch spezifische Methylierung der 23S rRNA reguliert wird. Das regulatorische System für die MLS-Resistenz ähnelt der als Attenuation bezeichneten Transkriptionskontrolle vieler Biosynthese-Operons und wird deshalb als "Translations-Attenuation" bezeichnet (Pestka, 1977). Chloramphenicol interagiert mit den Ribosomen, indem es die ribosomale Peptidyltransferase-Aktivität hemmt (Gale *et al.*, 1981). Die plasmidkodierte Chloramphenicol-Resistenz ist eine Folge der Acetylierung des Chloramphenicols durch die Chlor-

amphenicol-Acetyltransferase. Resistenzen gegenüber Penicillinen können zum einen durch ein chromosomal kodiertes β -Lactamase-Gen von *E. coli* über einen Mechanismus der Transkriptions-Attenuation hervorgerufen werden (Jaurin *et al.*, 1981), zum anderen durch plasmidkodierte β -Lactamasen, die sowohl in gram-negativen als auch in gram-positiven Bakterien (Samraoui *et al.*, 1986) gefunden wurden. Gut bekannt ist auch die Tetracyclin-Resistenz bei *E. coli*, die unter einem in *trans* wirkenden, negativem Kontrollelement steht (Altenbuchner *et al.*, 1983). Bezüglich der Rifampicin-Resistenz in *E. coli* weiß man bislang, daß sie auf Mutationen in der β -Untereinheit der RNA-Polymerase zurückgeht (Ovchinnikov *et al.*, 1981b, 1983; Boothroyd *et al.*, 1983; Lisitsyn *et al.*, 1984). Diese kleine Auswahl an Beispielen von Resistenzursachen vermitteln doch einen Eindruck über die in der Natur vorkommenden Vielfalt an Resistenzmechanismen. Allen diesen Resistenzen ist gemeinsam, daß entweder a) der Zielort des Antibiotikums verändert wird oder b) das Erreichen des Zielorts durch Inaktivierung des Antibiotikums oder durch Veränderung der Permeabilitätseigenschaften der bakteriellen Zellmembran eingeschränkt wird. Beide Formen findet man auch bei der Rifampicin-Resistenz: die Klasse der bereits oben erwähnten RNA-Polymerase-Mutanten und die Klasse der Aufnahmemutanten, deren Resistenz auf eine Veränderung der Membran-Permeabilität zurückzuführen ist (Tropschug, 1981; Kollenda, 1985). Als dritte Klasse kann man noch die von Dabbs und Looman (1981) und Dabbs (1982) beschriebenen Rif-D-Mutanten (Rifampicin dependent) erwähnen. Diese benötigen entweder Rifampicin oder Kasulgamycin zum Wachstum.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch molekularbiologische Untersuchungen an den von Tropschug (1981) als Rifampicin-resistent definierten *E.coli* Permeabilitätsmutanten mehr Einblick in die Entstehung und in den Mechanismus der Rifampicin-Resistenz zu gewinnen. Weiterer Gegenstand dieser Arbeit war, mögliche Parallelen zwischen dem den Permeabilitätsmutanten zugrundeliegenden und dem von Kollenda (1985), durch lysogene Mu-Insertion erzeugten und zwischen 28 und 37 Minuten auf dem *E.coli* Chromosom kartieren- den Resistenzgen herzustellen. Ferner wurde ein der Klasse der *rpoB*-Mutanten zugehöriges Resistenzgen kloniert, dieses molekularbiologisch untersucht und dann vergleichende Studien mit den bislang bekannten, zur Rifampicin-Resistenz führenden *rpoB*-Mutanten angestellt.

Kollenda (1981, 1985) konnte durch Pl-Transduktion die Übertragbarkeit eines DNA-Abschnitts mit Rifampicin-Mutation in einen Rifampicin-sensitiven *E.coli*-Stamm eindeutig zeigen. In der vorliegenden Arbeit wurden, ausgehend von den Rifampicin-Aufnahmemutanten 5/3 und 10/1t, der zur Rifampicin-Resistenz führende DNA-Abschnitt in Plasmidvektoren kloniert und in verschiedenen *E.coli*-Stämmen (DH1, HB101, JMB3) vermehrt. Die selektierten Klone zeichneten sich durch eine signifikante Rifampicin-Resistenz aus, wobei die RNA-Polymerasen ihre Sensitivität gegenüber Rifampicin beibehielten (Tab. 5).

An dieser Stelle möchte ich noch einmal das Selektionsverfahren zur Isolierung von Klonen mit Rifampicin-Resistenz ansprechen. Die anfängliche Idee zur Selektionierung war die direkte Plattierung des Transformationsgemisches auf rifampicinhaltige Agarplatten. Mit diesem Verfahren konnten jedoch keine Klone mit plasmidkodier-

ter Rifampicin-Resistenz isoliert werden. Es waren zwar nach längeren Bebrütungszeiten immer wieder Klone mit phänotypischer Rifampicin-Resistenz gewachsen, deren Resistenzursache war jedoch immer auf Spontanmutationen in der chromosomal kodierten β -Untereinheit der RNA-Polymerase zurückzuführen. Dies nimmt nicht Wunder angesichts der Tatsache, daß auf rifampicinhaltigem Medium Spontan-Mutationen mit einer Häufigkeit von 10^{-7} bis 10^{-8} entstehen können (Riva and Silvestri, 1972; Boothroyd *et al.*, 1983). Die Erkenntnis, daß durch bloßes Ausstreichen des Transformationsansatzes auf rifampicinhaltigem Medium keine direkte Selektion von Klonen mit plasmidkodierter Rifampicin-Resistenz möglich war, führte zu prinzipiellen Überlegungen zur Klonierbarkeit dieses zur Rifampicin-Resistenz führenden DNA-Abschnitts. Aus zahlreichen Untersuchungen an rifampicinresistenten, merodiploiden Stämmen (Tittawella, 1981, 1985; Ovchinnikov *et al.*, 1981, 1983; Lisitsyn *et al.*, 1984), das sind Stämme, die einen diploiden Satz an RNA-Polymerasen besitzen, wobei eine RNA-Polymerase sensitiv, die andere resistent ist, weiß man, daß diese Resistenz, je nach Lage der Mutationsstelle von dominanter oder rezessiver Natur sein kann. Überträgt man diese Erkenntnis auf das ursprünglich angestrebte Selektionsverfahren, muß man sich mit dem Gedanken auseinandersetzen, daß bei der Klonierung und Selektionierung dieses DNA-Abschnitts der Aufnahmeresistenz ebenfalls mit der Möglichkeit der Dominanz bzw. Rezessivität gerechnet werden muß. Das würde bedeuten, daß man im Falle einer Rezessivität keinerlei Chance auf eine Selektionierung des klonierten DNA-Abschnitts haben würde.

Neben dieser Frage der Dominanz bzw. Rezessivität gibt es einen weiteren Aspekt zu diskutieren, der die fehlende plasmidkodierte, phänotypische Resistenz gegenüber Rifampicin nach direktem Aus-

streichen des Transformationsansatzes erklären könnte. Die Diskussion dieses Aspekts zielt auf die Tatsache ab, daß ein auf dem Plasmid befindlicher, die Resistenz verleihender DNA-Abschnitt ein wohl nur gering verändertes Gegenstück zu einem Teil der chromosomalen DNA des sensitiven Wirts darstellt. Dies hätte zur Folge, daß ein plasmidkodiertes und die Resistenz induzierendes Genprodukt zunächst das chromosomal kodierte Wildtyp-Genprodukt austitrieren muß, bevor sich überhaupt, eine Dominanz vorausgesetzt, eine Resistenz manifestieren kann. So ist unschwer vorstellbar, daß bei einem unmittelbaren Ausstreichen des Transformationsansatzes auf rifampicinhaltige Agarplatten das sofort in das Cytoplasma der Zellen diffundierende Antibiotikum einen Wachstumsstillstand provoziert, noch ehe sich die plasmidkodierte Rifampicin-Resistenz etablieren kann. Die Ausprägung der Resistenz ist somit von einem Gen-Dosis-Effekt abhängig, der zugunsten der plasmidkodierten Resistenzeigenschaft gestaltet werden muß. Bei der Frage nach der Chance der Selektionierbarkeit des klonierten DNA-Abschnitts mit Rifampicin-Resistenz müssen also folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- 1) Die Rifampicin-Resistenz muß dominant sein, um überhaupt mittels Transformation auf den sensitiven Rezipientenstamm übertragbar zu sein.
- 2) Die Kopienzahl des Plasmids muß hoch genug sein, um das chromosomal kodierte, analoge Genprodukt des Wildtyps auszutitrieren, noch bevor der zunächst sensitive Wildtypstamm durch Rifampicin abgetötet wird.
- 3) Der Rezipientenstamm muß Rec^- sein, um eine Rekombination zwischen Plasmid und Chromosom zu verhindern.

Bei realistischer Einschätzung obig diskutierter Punkte mußte man unweigerlich zu der Erkenntnis kommen, daß die Chancen für eine phänotypische Ausprägung der Resistenz eigentlich nicht sonderlich hoch einzuschätzen waren. Man mußte sogar davon ausgehen, daß ein Klonieren dieses DNA-Abschnitts mit Rifampicin-Resistenz aus eben diesen Gründen nicht möglich ist.

Zur Wahrung der Klonierungschancen wurden im nachfolgend beschriebenen Selektionsverfahren oben besprochenen Überlegungen Rechnung getragen: damit sich eine genügend hohe Kopienzahl einstellen konnte, wurde das Transformationsgemisch zunächst auf ampicillinhaltiges, jedoch rifampicinfreies Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Klone zur Selektion auf rifampicinhaltiges Medium überimpft und erneut über Nacht bebrütet. Mit diesem Selektionsverfahren ist es schließlich gelungen, rifampicinresistente Klone zu isolieren, deren Resistenz Plasmid-kodiert war. Die minimale Hemmkonzentration an Rifampicin bewegte sich zwischen 40 und 100 µg/ml (Tab. 9).

Der von Klon 3d-1 (siehe 4.3.) abgeleitete Klon 3d^{rif} wurde eingehend untersucht. Die minimale Hemmkonzentration von 100 µg/ml (Tab. 10) liegt in derselben Größenordnung wie die des Ausgangsstammes *E.coli* 10/1t (Tab. 1), daraus ist der Schluß zu ziehen, daß die Übertragung dieses DNA-Abschnitts mit Rifampicin-Resistenz auf sensitive Stämme zu keiner Steigerung derselben führt. Ein auffälliges Phänomen bei der Anzucht in Flüssigkultur ist die beobachtbare 1-2stündige Phase verzögerten Wachstums nach Zugabe des Antibiotikums (Fig. 11). Diese Phase ist wohl als Adaptionsphase der Zellen an das Rifampicin zu betrachten, in der sich gemäß der oben vorgeschlagenen Hypothese die absterbenden und die die Resistenz ausbildenden Zellen die Waage halten, ehe sich dann die resistenten infolge einer Überproduktion ihres Genprodukts einen

Selektionsvorteil verschaffen. Diese Hypothese steht im Einklang mit einem bereits oben postulierten Gen-Dosis-Effekt der Hemmwirkung. Es muß hier noch einmal betont werden, daß nach der Transformation von Rifampicin-sensitiven *E.coli*-Stämmen mit diesem, die Resistenz vermittelnden Gen heterodiploide Stämme erzeugt werden. Geht man davon aus, daß die Resistenz auf eine veränderte Permeabilität der Membran für das Rifampicin zurückgeht, so ist die Dominanz hinsichtlich der Resistenz überraschend.

Man kann an dieser Stelle auch geneigt sein, der Resistenzausbildung ein Induktionsphänomen zugrunde zu legen, wie es z.B. für die Erythromycin- (Weisblum, 1984) oder die Chloramphenicol-Resistenz (Horinouchi and Weisblum, 1982) beschrieben ist. Um dieser Frage nun auch nachzugehen, wurde das Resistenzplasmid von Klon 3d^{rif} unter sublethalen Dosen (1-5 µg/ml) an Rifampicin transformiert und das Transformationsgemisch dann direkt rifampicinhaltigen Medien (auf Platte und in Flüssigkultur) ausgesetzt. Hierbei waren jedoch keinerlei Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen induzierter und nicht-induzierter Probe festzustellen (nicht gezeigt). Dieser Befund deckt sich auch mit einem Ergebnis von Kollenda (1985), die bei der *in vitro* durchgeführte Genexpression des Plasmids von Klon 3d^{rif} in Gegenwart von Rifampicin keine gesteigerte Expression des Genprodukts feststellen konnte, daraus läßt sich wiederum folgern, daß das Genprodukt konstitutiv synthetisiert wird.

Die Sequenzanalyse des Resistenzgens 3d^{rif} ergab eine Länge von 2145 bp (Fig. 21). Die Sequenz enthält zwei offene Leserahmen, die für ein 106 Aminosäuren (Molekulargewicht 11424 Dalton) und ein 452 Aminosäuren langes (Molekulargewicht von 48486 Dalton) Poly-

peptid kodieren. Beiden Polypeptidketten geht dem jeweiligen Initiationnscodon ATG die für eine effiziente Translation notwendige ribosomale Bindungsstelle, nämlich die zur 16S rRNA komplementären, sog. Shine-Dalgarno-Sequenz voraus (Shine and Dalgarno, 1974). Weniger eindeutig gestaltet sich die Frage nach der Transkriptionskontrolle. In der 5'stromaufwärts gelegenen Region des Leserahmen A finden sich zwei benachbarte Strukturen (P1 und P2, siehe Fig. 21), welche der Consensus-Sequenz von *E.coli* Promotoren (Pribnow, 1975; Hawley and McClure, 1983) ähnlich sind (Tab. 14), wobei die als P2 bezeichnete Struktur am besten mit der "idealen" Promotor-Consensus-Sequenz übereinstimmt. Dieser Befund erlaubt jedoch noch keine Aussage darüber, ob nun beide oder nur einer oder welcher von beiden Strukturen *in vivo* als Promotor benutzt wird. Eine Klärung würde die Klonierung dieser fraglichen Region in "Promotor-Test"-Plasmide oder eine Kartierung dieses Bereiches mit S1 Nuklease erbringen. Am 3'-Ende von Leserahmen A, nämlich in der nicht-translatierten Region zwischen Leserahmen A und B (Fig. 21) findet man eine GC-reiche Region, deren Sequenz einer stabilen Haarnadelstruktur ($\Delta = 71$ kJ/mol) in der mRNA entspricht (Fig. 22). Diese Struktur könnte die Rolle eines rho-unabhängigen Terminationssignals zukommen (Brendel and Trifonov, 1983).

Schwieriger gestaltet sich das Auffinden von Transkriptionssignalen bei Leserahmen B. Hier läßt sich nicht nur in der 5'stromaufwärts gelegenen Region keine zwingende Promotorstruktur, sondern auch in der 3'stromabwärts gelegenen Region kein eindeutiges Terminationssignal erkennen. Diese Befunde deuten darauf hin, daß *in vivo* eine polycistronische mRNA synthetisiert wird, welche unter der Kontrolle des Promotors P2 steht. Das Fehlen eines eindeutigen Terminationssignals am 3'Ende von Leserahmen B könnte dadurch erklärbar sein, daß ein möglicher Terminator von der Klonierung

nicht mehr erfaßt wurde, nachdem das Ende dieses Leserahmens nur 60 Basen vom Ende des klonierten Fragments entfernt ist. Geht man von der Existenz einer Transkriptionseinheit aus, dann bleibt zu klären, welche Rolle der in der intergenischen Region zwischen Leserahmen A und B positionierten, terminatorähnlichen Struktur zufällt (vgl. 4.5.4.). Einerseits kann man sich durchaus vorstellen, daß sie im Transkriptionsprozeß "überlaufen" wird, andererseits ist es durchaus diskussionswert, ob sie Bestandteil einer auf Translationsebene wirkenden Regulationseinheit ist. Eine Berechtigung findet dieser Diskussionspunkt durch die Beobachtung, daß diese Terminatorstruktur unmittelbar der potentiellen ribosomalen Bindungsstelle benachbart ist (Fig. 21). Daraus erwächst die Vorstellung, daß durch Sekundärstrukturbildung in der mRNA ein Einfluß auf den Zugang der Ribosomen an die ribosomale Bindungsstelle entsteht, Rifampicin aber auf dieses Struktur destabilisierende Wirkung zeigt und dadurch regulatorisch in die Translation des Leserahmens B eingreift. Dieses würde wiederum bedeuten, daß das von Leserahmen B kodierte Polypeptid für die Ausbildung der Rifampicin-Resistenz essentiell ist. Ähnliche Mechanismen postuliert man auch für die Wirkungsweise einiger Chloramphenicol-Resistenzgene (Williams *et al.*, 1981; Brenner and Shaw, 1985).

Die Existenz der beiden Genprodukte von Klon 3d^{r1f} konnte bereits in *in vitro* und *in vivo* Expressionsstudien gezeigt werden (Kollenda, 1985; Skrobranek, pers. Mitt.). Damit bleibt aber noch immer die Frage offen, ob beide Genprodukte zusammen oder ob nur eines von beiden für die Ausbildung der Resistenz verantwortlich zeigt. Geklärt werden könnte diese Frage durch Versuche mit anti-sense RNA, analog den Regulationsmechanismen der *ompF*- und *ompC*-Gene über die micRNA (mRNA-interfering complementary RNA) (Mizuno *et al.*, 1984).

Die notwendige Voraussetzung, Einsicht in den Resistenzmechanismus zu gewinnen besteht in der Klärung der Frage, um welche Art von Proteinen es sich handelt und wo diese lokalisiert sind. Die früheren Versuche von Tropschug (1981) und Kollenda (1981, 1985) erbrachten Hinweise, daß der Aufnahme-Resistenz bei *E.coli* Änderungen in der Proteinzusammensetzung der äußeren Membran zugrundeliegen. Würden in der Tat Proteine der äußeren Membran an der Resistenzentstehung beteiligt sein, sollten die Genprodukte des klonierten Resistenzgens 3d^{r1f} die typische Struktur von äußeren Membranproteinen aufweisen. Bekanntermaßen zeichnen sich Proteine der äußeren Membran durch einen stark hydrophoben Charakter und durch den Besitz einer abspaltbaren, aminoterminalen Signalsequenz aus, welche für die Translokation der Proteine erforderlich ist (Nikai-do and Wu, 1984). Jedoch keines der beiden hypothetischen Proteine besitzt am Amino-Ende die Struktur eines typischen Signalpeptids (v. Heijne, 1984). Die Analyse der beiden Proteine hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung (Fig. 24; Tab. 17) und die Computeranalyse bezüglich der Sekundärstruktur (Fig. 25) nach den Regeln von Chou und Fasman (1974) erbrachte starke Hinweise dafür, daß es sich bei diesen hypothetischen Proteinen um integrale Membranproteine handelt und daß, wegen der offenbar fehlenden Signalsequenzen, nicht periplasmatische oder Proteine der äußeren Membran vorliegen.

Die Codon-Auswertung der Aminosäuren (vgl. Tab.18 und Kap. 4.4.4.) deutet auf schwach exprimierte Proteine hin und spricht somit gegen das Vorliegen von Proteinen der äußeren Membran hin, da diese zumeist in Überschuß vorhanden sind (10^3 - 7×10^5 Kopien/Zelle) (Voordouw and Brenner, 1985). Diese Befunde sprechen für die Einordnung als Proteine der inneren Membran, die noch gestärkt wird durch das bekannte Phänomen, daß für die Inkorporation hydrophober

Proteine in die innere Membran keine Signalsequenzen notwendig sind (Oliver, 1985; Ames, 1986). Beispiele für Proteine der cytoplasmatischen Membran, die keinerlei Signalsequenz aufweisen, aber dennoch in die Membran integriert werden, sind die Proteine HisP, HisQ und HisM (Ames and Nikaido, 1978) ebenso wie die Produkte der *malF* und *malK*-Gene (Shuman *et al.*, 1980).

Zur endgültigen Feststellung, ob die fraglichen Proteine nun der äußeren oder inneren Membran oder gar dem Periplasma angehören, wird die Durchführung von Pulsmarkierungsexperimenten und Fraktionierung der Zellbestandteile vordergründige Aufgabe sein.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die beiden Genprodukte wahrscheinlich Proteine der inneren Membran verkörpern. Offen bleibt aber die Funktion dieser Proteine bei der Resistenzausbildung. Vorstellbar ist, daß diese beiden Proteine vorhandene Transportkanäle verschließen und dadurch die Permeabilität der Membran für das Antibiotikum herabsetzen. Ähnliche Mechanismen wurden bei den Antibiotika Tetracyclin und β -Lactamase festgestellt, bei denen Mutationen der Porine in der äußeren Membran eine Resistenz bewirkten (Harder *et al.* 1981; Komatsu *et al.*, 1981). Ausschließen möchte ich die Möglichkeit, daß den beiden Genprodukten eine enzymatische Aktivität zukommt, infolge der das Rifampicin abgebaut wird. Denn es ist schwer vorstellbar, daß eine durch chemische Mutagenese erzeugte Rifampicin-Resistenz gleichzeitig die Entstehung einer spezifischen, gegen das Rifampicin gerichteten Enzymaktivität bewirkt.

Nach den bislang vorliegenden Daten kann man eine Verwandtschaft oder sogar Identität mit dem von Seydel *et al.* (1981) beschriebenen Rifampicin-bindenden rb-Protein ebenfalls ausschließen, da zum

einen dessen Molekulargewicht von 36000 Dalton mit den oben beschriebenen (11424 bzw. 48486 Dalton) nicht übereinstimmt, zum anderen auch die Bindungskonstante (10^{-4}) des rb-Proteins für Rifampicin zu niedrig ist, um allein für eine Resistenz dieses Ausmaßes verantwortlich zu sein.

Mit der Klonierung und Sequenzierung des zum Resistenzgen $3d^{rif}$ homologen Gens aus dem Wildtyp AB1157 waren berechnete Hoffnungen verknüpft, mehr über die molekularen Ursachen der Resistenz sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene zu erhalten. Das dem $3d^{rif}$ -Resistenzgen entsprechende Gegenstück wurde aus der erstellten *E.coli* AB1157-Genbank isoliert (siehe 4.6.1.), anschließend bezüglich seines Verhaltens gegenüber Rifampicin untersucht und später auch sequenziert (vgl. 4.6.4.). Der die homologe DNA aus dem Wildtyp tragende und als WT- α bezeichnete Klon erweist sich gegenüber Rifampicin äußerst sensitiv. Die minimale Hemmkonzentration an Rifampicin liegt in derselben Größenordnung wie die des *E.coli* Wildtypstammes (Tab. 16). Die Nukleotidsequenz zeigt in allen Positionen, bis auf eine Insertion von 4 Gs bei Position 1263 (siehe Fig. 33), Übereinstimmung. Ein bei Position 227, im nicht kodierenden Bereich postulierter Basenaustausch von G+A kann nicht eindeutig festgestellt werden, da an dieser Position sowohl in der G- als auch in der T-Spur noch zusätzliche Signale zu erkennen sind. Dieser Basenaustausch hätte aber keinen Einfluß weder auf die hypothetischen Promotorstrukturen (Tab. 14) noch auf die beiden Leserahmen A und B. Die zusätzlichen 4 Gs jedoch führen zu einer Rasterverschiebung des Leserahmens B mit der Konsequenz, daß sich der offene Leserahmen verkürzt und somit ein kleineres Genprodukt mit einem Molekulargewicht von nur noch 24866 Dalton entsteht (siehe 4.6.6. und Fig. 30).

Lassen diese Befunde eine Schlußfolgerung auf eine mögliche Resistenzursache zu? Nachdem Leserahmen A von keiner Mutation betroffen ist, kann man davon ausgehen, daß das davon abgeleitete Protein wohl nicht als primäre Ursache für die Resistenzausbildung in Frage kommt. Vielmehr ist bei dem größeren Protein des Leserahmen B mit dem Molekulargewicht von 48486 Dalton anzusetzen. Die Insertion der 4 Gs bewirkt im Wildtyp also eine Verlängerung des ursprünglich nur 231 Aminosäuren umfassenden Proteins um 221 Aminosäuren. Das dabei entstehende, nun doppelt so große Genprodukt kann in der Weise der Auslöser für die Manifestierung der Rifampicinresistenz sein, daß es einen in der Wildtypzelle ursprünglich vorhandenen Transportkanal verschließt und so dem Antibiotikum den Weg durch die Membran verwehrt (siehe auch oben).

Die Aufklärung des Resistenzmechanismus kann eigentlich nur dann erfolgreich zu Ende geführt werden, wenn es gelingt, beide Genprodukte des Klon 3d^{rif} zu isolieren. Nachdem für diese hypothetischen Proteine kein Testsystem existiert, muß versucht werden, über Expressionsvektoren größere Proteinmengen zu synthetisieren, welche dann zur Antikörperherstellung verwendet werden können, um später über Antikörper-Affinitätssäulen die fraglichen Proteine aus den Zellextrakten anzureichern. Eine weitere Möglichkeit der Erzeugung eines Antigens besteht darin, durch Computeranalyse der Nukleotidsequenz von Klon 3d^{rif} eine antigene Stelle des hypothetischen Proteins ausfindig zu machen und die entsprechende Sequenz dann als Oligopeptid synthetisch herzustellen, welches dann als Antigen für die Herstellung von Antikörpern dienen könnte. Für die Zukunft interessant wäre auch die Durchführung von Experimenten, die sich mit der Frage befassen, welche Funktion die Wildtypform dieser beiden Proteine in *E.coli* ausübt.

Die Daten der Hybridisierungsexperimente, die zur Überprüfung der Frage nach der Identität zwischen dem durch lysogene Mu-Insertion erzeugten Rifampicin-Resistenzgen *rif^M* (Kollenda *et al.*, 1986) und dem Resistenzgen *3d^{rif}* durchgeführt wurden, reichen nicht aus, auf diese Frage eine schlüssige Antwort zu geben (siehe 4.7.). Die bisherigen Befunde deuten aber darauf hin, daß Genort *rif^M* und der von *3d^{rif}* und somit auch deren Gene nicht übereinstimmen (vgl. dazu Argumentation in 4.7.). Erschwert wird die Interpretation der Hybridisierungsexperimente dadurch, daß bei den Mu-Mutanten der Phage offensichtlich nicht mehr in der ursprünglichen Größe integriert ist (Fig. 35). Um die Frage nach der Identität dieser beiden Gene genau beantworten zu können, schlage ich vor, zum einen weitere Southernblot-Analysen unter Verwendung verschiedener, der Restriktionskarte des Phagen Mu (Fig. 34) und der des Resistenzgens *3d^{rif}* (Fig. 14) zu entnehmenden Enzymkombinationen durchzuführen, zum anderen die Integrationsbereiche des Phagen Mu innerhalb der Mutanten zu klonieren und diese dann zu sequenzieren. Für die Identifizierung positiver Klone bietet sich die Verwendung synthetischer Oligonukleotide an, deren Nukleotidsequenz den bereits sequenzierten Enden des Bakteriophagen Mu zu entnehmen wäre (Priess *et al.*, 1982; Plasterk *et al.*, 1984; Groenen *et al.*, 1985).

Kollenda (1985) und Kollenda *et al.* (1986) zeigten, daß die Mu-Mutanten *Rif^{M1}*, *Rif^{M3}*, *Rif^{M4}*, *Rif^{M5}* in derselben Region, zwischen *cysB38* (28 min) und *arsD* (37 min) auf dem *E.coli* Chromosom kartieren, wobei sich diese unabhängig voneinander isolierten Mutanten durch ein unterschiedliches Maß der Resistenz auszeichnen. Erklärt wird diese Varianz der Resistenz durch die unterschiedliche Auswirkung des Insertionsorts von Mu (Kollenda, 1985). Dieser Aussage zufolge würde der Phage Mu zwar innerhalb einer begrenzten Region

des Chromosoms, aber an unterschiedlichen Stellen insertieren, wobei verschiedene, Resistenz-auslösenden Genprodukte entstehen, die wiederum für das unterschiedliche Ausmaß der Resistenz verantwortlich sind. Die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente liefern aber starke Hinweise dafür, daß die untersuchten Mu-Mutanten RifM1, RifM3 und RifM4 völlig identisch sind, denn die Hydrolyse der DNA dieser 3 Mutanten und die anschließend durchgeführte Southernblot-Hybridisierung gegen die β -Lactamase und auch gegen das $3\delta^{rif}$ -Gen erbrachte eine völlige Übereinstimmung des Hybridisierungsmuster (Fig. 35), welches beim Vorliegen verschiedener Insertionsorte doch gewisse Abweichungen zeigen sollte. Die oben beschriebene phänotypische Varianz dieser 3 Mutanten bezüglich der Resistenz ist somit nicht schlüssig.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte auch aus einem Rifampicin-resistenten *E.coli*-Stamm ein zur Klasse der *rpoB*-Mutanten zuzurechnendes Rifampicin-Resistenzgen kloniert werden, dessen Resistenzeigenschaft durch Transformation auf sensitive *E.coli*-Stämme übertragen werden kann. Die Länge des DNA-Abschnitt mit Rifampicin-Resistenz beträgt etwa 6 kb und entspricht einem Teil des *rpoB*-Operons, auf dem die Gene für einige ribosomale Proteine und für die β - und β' -Untereinheiten der RNA-Polymerase liegen (Lindahl *et al.*, 1977; Post *et al.*, 1979; Yamato and Nomura, 1978, 1979). Genauer gesagt umfaßt das klonierte Fragment einen Teil des *rplJ*-, das *rplL*-, das *rpoB*-Gen, sowie einen DNA-Teil nicht identifizierbarer Herkunft. Die Anwesenheit dieser Fremd-DNA ist dadurch erklärbar, daß bei der Erstellung der Genbank ein zusätzliches Ligationsereignis zwischen dem *rpoB*-Fragment und einem anderen zel-

lulären DNA-Fragment mit kompatiblen Enden stattgefunden hat (Vektor-Insert-Insert-Ligierung). Ein ähnliches Phänomen wurde auch von Lisitsyn und Mitarbeiter (1984) beobachtet, die das *EcoRI*-G-Fragment des *rpoBC*-Operons aus einer mit *EcoRI* hydrolisierten zellulären DNA klonierten, jedoch nach einer Restriktionsanalyse feststellen mußten, daß neben dem gewünschten *EcoRI*-G-Fragment ein zusätzliches *EcoRI*-Fragment unbekannter Herkunft kloniert worden war. Die meisten, zur Rifampicin-Resistenz führenden Mutationen finden sich in zwei Domänen des *rpoB*-Gens, die an der Rifampicinbindung beteiligt sein sollen (Ovchinnikov *et al.*, 1981, 1983; Lisitsyn *et al.*, 1984). Die soeben zitierten Autoren vertreten die Auffassung, daß das Rifampicin-Bindungszentrum mit dem des RNA-Produkt-Bindungscentrums überlappt und sie mutmassen, daß der nahe der Mutationsstelle Val¹⁴⁶→Phe befindliche, ungewöhnliche "Cluster" der 4 basischen Aminosäuren Arg²⁰⁰-Arg²⁰¹-Arg²⁰²-Lys²⁰³, zusammen mit dem "Cluster" His⁵²⁶-Lys⁵²⁷-Arg⁵²⁸-Arg⁵²⁹ (vgl. Fig. 43), in dessen naher Umgebung die Mutationen an den Aminosäurepositionen 516, 531 und 564 (Fig. 43) lokalisiert sind, die RNA-Produkt-Bindungsstelle und somit auch das aktive Zentrum des Enzyms darstellt.

Vier Mutationsorte sind bislang durch Sequenzanalyse eindeutig identifiziert worden (siehe Fig. 43): einer in der Domäne 1 (Basenaustausch an Position 517) und drei in der Domäne 2 (Basenaustausche an den Positionen 1547, 1592 und 1690). Je nach Mutationsort gestaltet sich die Rifampicin-Resistenz in mero-diploiden Stämmen entweder dominant oder rezessiv (Ovchinnikov *et al.*, 1981; Boothroyd *et al.*, 1984). Die Eigenschaft der Rifampicin-Resistenz des als *rpoB^{Rif}* bezeichneten Klons geht ebenfalls auf eine in der β -Untereinheit befindlichen Mutation zurück. Die Mutation konnte durch Sequenzanalyse als Basenaustausch von A→G bei Position 1552

lokalisiert werden. Sie liegt somit in derselben Region wie die bislang innerhalb der zweiten Domäne (Aminosäure 515 - 565) identifizierten Mutationen (vgl. Fig. 42 und 43), stellt aber eine völlig neue *rpoB*-Mutante dar. Der Basenaustausch führt zu einem Ersatz der neutralen Aminosäure Asn⁵¹⁸ durch die geladene Asp (vgl. Fig. 42) und dieser einzelne Basenaustausch reicht schon aus, der RNA-Polymerase eine Resistenz gegenüber Rifampicin zu verleihen, die sich zudem als dominant erweist. Um sicher zu stellen, daß es sich hier um eine wirklich dominante Resistenz handelt und um kein Rekombinationsereignis zwischen der plasmidkodierten, mutierten und der Wildtyp-RNA-Polymerase, wurden *recA*⁻-Stämme verwendet. Welcher Mechanismus dieser Resistenz zugrundeliegt bleibt ebenso zu klären, wie die Frage, warum die eine Mutation in der β -Untereinheit zu einer rezessiven, die andere dagegen zu einer dominanten Resistenz führt (Ovchinnikov *et al.*, 1981b, 1983; Boothroyd *et al.*, 1984). Was den Resistenzmechanismus betrifft, ist es durchaus vorstellbar, daß durch einen Basenaustausch die RNA-Polymerase eine andere Konformation einnimmt und sich auf diese Weise einer Interaktion mit dem Rifampicin entzieht.

Wegen der Existenz dieser neuen *rpoB*-Mutante, fällt es schwer, dem von Lipkin *et al.* (1984) vorgeschlagenen Modell zur Aufklärung des Mechanismus der Rifampicinwirkung und zur Entstehung der Resistenz Glauben zu schenken. Die von Lipkin angeführte Argumentation für die Rechtfertigung seines Modells soll hier noch einmal in Kürze repetiert werden: Durch Untersuchungen der zyklischen Synthese von RNA-Oligonukleotiden in Gegenwart von Rifampicin konnten Lipkin und Mitarbeiter zeigen, daß Rifampicin nicht die Synthese von Di- und Trinukleotiden, sondern nur die Synthese längerer Oligonukleotide hemmt. Als Erklärung wird angegeben, daß das an die RNA-Po-

lymerase gebundene Antibiotikum die Region der Bindungsstelle des RNA-Produkts besetzt, was wegen einer Analogie in der räumlichen Struktur zwischen Rifamycin und der RNA möglich wäre. Zur Überprüfung dieser Analogie wurde ein Dreiding-Modell von Rifamycin B und dem hybriden Poly(rA)Poly(dT) gebaut. Der Vergleich dieser beiden Strukturen erbrachte eine beträchtliche Übereinstimmung der räumlichen Struktur von Rifamycin B und dem Dinukleotidfragment der RNA: beim Übereinanderlegen dieser Strukturen weisen die ansa-Kette des Rifamycins und das Zuckerphosphatskelett des Dinukleotids in die gleiche Richtung; auch die Position der funktionell wichtigen Hydroxylgruppen bei C21 und C23 fallen mit der 3'-und 2'-Gruppe des zweiten Riboserestes zusammen. Daraus wurde ein Modell der Interaktion zwischen Rifampicin und der RNA-Polymerase abgeleitet. Diesem Modell zufolge besetzt das Antibiotikum die Stelle des ersten und zweiten Nukleotids des synthetisierten Pentaribonukleotids und verhindert somit aus sterischen Gründen die normale Synthese von Tetra- oder Oligonukleotiden.

Diesen gedanklichen Ansatz spielten Lipkin und Mitarbeiter mit der Rifampicin-resistenten RNA-Polymerase der Mutante *rpoB255*, welche an der Aminosäurenposition 516 die Asparaginsäure durch ein Valin ersetzt hat (Ovchinnikov *et al.*, 1981, 1983), noch einmal durch: im Falle der Wildtyp-RNA-Polymerase bildet der Asp-Rest von Position 516 eine Wasserstoffbindung mit der Hydroxylgruppe von C23 des Rifamycins. Diese Wasserstoffbindung fehlt nun bei dem Rifampicin-resistenten Enzym der Mutante *rpoB255*, bei dem die Asp⁵¹⁶ durch ein Valin ersetzt ist. Daraus resultiert eine Destabilisierung des gebildeten Komplexes. Wenn nun das vorgeschlagene Modell korrekt ist, und auch die räumliche Anordnung des Rifamycins im Komplex mit der RNA-Polymerase analog der räumlichen Anordnung des Dinukleotid-Fragments des synthetisierten RNA-Oligonukleotids,

dann sollte Asp⁵¹⁶ der sensitiven β -Untereinheit eine Wasserstoffbindung mit dem 2'-Hydroxylgruppe der wachsenden RNA bilden. Da diese Wasserstoffbindung im Falle der *rpoB*255-Mutante nicht mehr gebildet werden kann, sollten sich die sensitiven und resistenten RNA-Polymerasen in der Bindungsstärke der synthetisierten RNA-Oligonukleotide unterscheiden.

Nachdem die von mir beschriebene *rpoB*-Mutante an Position 518 der β -Untereinheit, also zwei Aminosäuren weiter, einen zur dominanten Rifampicin-Resistenz führenden Aminosäureaustausch zu verzeichnen hat, muß das Lipkin-Modell der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Rifampicin und einem RNA-Produkt neu überdacht werden. Stimmt dieses Modell, dann müßte im Falle des *rpoB*^{Rif}-Klons beim Vorliegen einer β -Faltblattstruktur die Wechselwirkung zwischen der Aminosäure Asp⁵¹⁶ und der Aminosäure Asp⁵¹⁸ eine derartige Veränderung der räumlichen Struktur bewirken, daß eine Wasserstoffbindung zwischen der Hydroxylgruppe von C23 des Rifampicins nicht mehr zustandekommt; dies ist jedoch nicht wahrscheinlich. Beim Vorliegen einer α -helikalen Struktur ist die Aminosäure Asp⁵¹⁸ von der Aminosäure Asp⁵¹⁶ um etwa 200° (2.94 Å) in Richtung der Schraubenachse verdreht und kann somit keine Wechselwirkung mit der Aminosäure Asp⁵¹⁶ zeigen, die die von Lipkin geforderte Wasserstoffbindung zwischen der Aminosäure Asp⁵¹⁶ und dem Rifampicin stören und so eine Resistenz bewirken könnte.

Mehr Einblick in den Resistenzmechanismus bei *rpoB*-Mutanten ist eventuell dadurch zu erhalten, daß man gezielt Mutationen in die Region des Rifampicin-Bindungszenstrum, dem vermeintlich aktiven Zentrums (siehe oben), einführt und dann die Auswirkung auf die Rifampicinverträglichkeit in heterodiploiden Stämmen untersucht. Die eine Möglichkeit, das aktive Zentrum der RNA-Polymerase fest-

zustellen besteht darin, in die diskutierten Bereiche des aktiven Zentrums der klonierten β -Untereinheit gezielt Mutationen einzuführen, die so veränderte β -Untereinheit über Expressionsklonierung anzureichern und dann in Rekonstitutionsexperimenten (Heil and Zillig, 1970) mit den anderen Untereinheiten der RNA-Polymerase die Aktivität des Enzyms zu überprüfen. Die andere Möglichkeit besteht darin, die gezielt mutierte und expressionsklonierte β -Untereinheit über die Methode der selektiven Affinitätsmarkierung des aktiven Zentrums der RNA-Polymerase (Grachev and Zaychikov, 1983; Grachev *et al.*, 1986) zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit konnte -meines Wissens nach in der Literatur noch nicht beschrieben- auch die enzymatische Sequenzierung von chromosomaler, prokaryontischer DNA nach dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren gezeigt werden. Bei der Ermittlung der Versuchsbedingungen für das genomische Sequenzieren erwies sich die alkalische Denaturierung (Chen and Seeburg, 1985) der ungespaltenen, genomischen DNA für die Erzeugung einzelsträngiger Matrizen-DNA als ungeeignet. Erst nach Restriktionspaltung der chromosomalen DNA und anschließender Hitze-Denaturierung (Wallace *et al.*, 1981) des erhaltenen Fragmentgemisches war eine für die direkte Sequenzierung geeignete DNA-Matrize geschaffen.

Nachdem diese Technik relativ schnell und einfach durchführbar ist, ist sie meiner Meinung nach dem von Church und Gilbert (1984) beschriebenen Verfahren des genomischen Sequenzierens überlegen. Überhaupt eröffnen sich mit dieser Technik eine Vielzahl analytischer Möglichkeiten: die Identifizierung von Mutationen oder Deletionen in einem definierten Bereich innerhalb der genomischen DNA. Die Analyse von Integrationsstellen springender Elemente in der

Wirts-DNA, die Überprüfung der Intaktheit künstlich in die Wirts-DNA eingeführter Gene.

Es muß an dieser Stelle jedoch betont werden, daß diese Technik lediglich an prokaryontischer chromosomaler DNA durchgeführt wurde. Möchte man dieses Verfahren auf eukaryontische DNA übertragen, sind wegen der Komplexität der DNA höherer Organismen wohl einige Parameter zu variieren: Verwendung längerer Oligonukleotide als "Primer", Einsatz größerer DNA-Mengen oder Amplifizierung von DNA-Abschnitten z.B. über Gelreinigungsverfahren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Von Tropschug (1981) wurde eine durch Nitrosoguanidin-Behandlung erzeugte Rifampicin-resistente *E.coli* Mutante erhalten, deren RNA-Polymerase gegenüber Rifampicin sensitiv ist. Aus dieser Mutante wurde der für die Ausbildung der Resistenz verantwortliche DNA-Bereich in pBR322 und pUC12 kloniert und vollständig sequenziert. Das kleinste Fragment, das noch das Resistenzphänomen durch Transformation auf sensitive *E.coli* Stämme übertragen kann, hat eine Länge von 2145 bp. In diesen heterodiploiden Stämmen, die sowohl das mutierte als auch das Wildtypgen enthalten, liegt hinsichtlich der Rifampicin-Resistenz Dominanz vor.
2. Unter Verwendung einer DNA-Probe gelang es, das homologe DNA-Fragment des *E.coli* Wildtypstammes zu klonieren und zu sequenzieren. Ein Vergleich der beiden Sequenzen zeigt, daß bei der Behandlung mit Nitrosoguanidin 4 Guaninreste bei der Position 1263 verlorengegangen sind. Der Vergleich macht auch wahrscheinlich, daß in Position 227 ein G gegen A ausgetauscht ist.
3. Die Sequenz der Wildtyp-DNA läßt zwei hypothetische Leserahmen von 11424 bzw. 24866 Dalton erkennen. Beide Leserahmen besitzen im korrekten Abstand eine ribosomale Bindungsstelle. Im 5'strom-aufwärts gelegenen Bereich des hypothetischen Proteins mit 11424 Dalton lassen sich zwei Sequenzen mit großer Promotorähnlichkeit erkennen, was bei dem Protein mit 24866 Dalton nicht der Fall ist. Dies spricht für das Vorliegen einer Operonstruktur. Die durch Mutagenese bewirkte Deletion von 4 Gs bewirkt

eine Rasterverschiebung und Verlängerung des Leserahmens von ursprünglich 231 auf 454 Codons. Der mögliche Basenaustausch von G gegen A liegt außerhalb des Leserahmens und der Promotorregion.

4. Von Kollenda (1985) wurden durch lysogene Infektion mit dem Bakteriophagen Mu Rifampicin-resistente *E.coli* Mutanten erzeugt, deren RNA-Polymerasen gegenüber Rifampicin sensitiv sind. Durch Southernblot-Analyse wurde gezeigt, daß die Lokalisation des durch den Bakteriophagen Mu erzeugten Resistenzgens und das durch Nitrosoguanidin-Behandlung erzeugte, 2145 bp langen Resistenzgen nicht identisch sind.

5. Aus einer anderen, von Tropschug (1981) erhaltenen, Rifampicin-resistenten *E.coli* Mutante wurde der die Resistenz vermittelnde DNA-Abschnitt in pUC12 kloniert. Die Resistenz ist durch Transformation auf sensitive Wildtypstämme übertragbar, wobei in diesen heterodiploiden Stämmen Dominanz hinsichtlich der Resistenz vorliegt. Die Sequenzbestimmung ergab, daß ein DNA-Abschnitt, der für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert, erfaßt worden war. Durch partielle Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, daß die zur Rifampicin-Resistenz führende Mutation bei Aminosäure 518, in einer 50 Aminosäuren (515-565) umfassenden Domäne liegt, wobei ein Basenaustausch von A-G vorliegt und die neutrale Aminosäure Asn in die geladene Aminosäure Asp überführt wird. Damit wurde ein neuer Typ einer rpoB-Mutante gefunden.

7. ANHANG

ENZYM	SCHNITTSTELLEN		FRAGMENTE		FRAGMENTENDEN	
	Anzahl	Position	Länge	%		
ACC 1 (GTVWAC)	2					
		201	1783	(83.1)	362	2145
		362	201	(9.4)	1	201
			161	(7.5)	201	362
AHA 3(DRA 1) (TTTAAA)	2					
		647	1450	(67.6)	695	2145
		695	647	(30.2)	1	647
			48	(2.2)	647	695
ALU 1 (AGCT)	2					
		37	1260	(58.7)	885	2145
		885	848	(39.5)	37	885
			37	(1.7)	1	37
AVA 2 (GGRCC)	1					
		1894	1894	(88.3)	1	1894
			251	(11.7)	1894	2145
BAM H1 (GGATCC)	2					
		1	2139	(99.7)	1	2140
		2140	5	(0.2)	2140	2145
			1	(0.0)	1	1
BSSH 1 (GCGCGC)	2					
		389	1088	(50.7)	389	1477
		1477	668	(31.1)	1477	2145
			389	(18.1)	1	389
CLA 1 (ATCGAT)	1					
		2084	2084	(97.2)	1	2084
			61	(2.8)	2084	2145
DDE 1 (CTNAG)	4					
		84	1231	(57.4)	914	2145
		187	695	(32.4)	187	882
		882	103	(4.8)	84	187
		914	84	(3.9)	1	84
			32	(1.5)	882	914

ECO R5 (GATATC)

1				
	2058	2058 (95.9)	1	2058
		87 (4.1)	2058	2145

FNUD 2 (CGCG)

5				
	103	886 (41.3)	390	1276
	390	607 (28.3)	1538	2145
	1276	287 (13.4)	103	390
	1478	202 (9.4)	1276	1478
	1538	103 (4.8)	1	103
		60 (2.8)	1478	1538

HAE 3 (GGCC)

9				
	59	486 (22.7)	1659	2145
	81	409 (19.1)	81	490
	490	361 (16.8)	490	851
	851	279 (13.0)	851	1130
	1130	239 (11.1)	1191	1430
	1191	174 (8.1)	1430	1604
	1430	61 (2.8)	1130	1191
	1604	59 (2.8)	1	59
	1659	55 (2.6)	1604	1659
		22 (1.0)	59	81

HGA 1 (GACGC)

3				
	930	930 (43.4)	1	930
	1514	584 (27.2)	930	1514
	1939	425 (19.8)	1514	1939
		206 (9.6)	1939	2145

HIND 3 (AAGCTT)

2				
	36	1261 (58.8)	884	2145
	884	848 (39.5)	36	884
		36 (1.7)	1	36

HINF 1 (GATTC)

4				
	558	1062 (49.5)	558	1620
	1620	558 (26.0)	1	558
	1757	322 (15.0)	1823	2145
	1823	137 (6.4)	1620	1757
		66 (3.1)	1757	1823

HPA 2 (MSP 1) (CCGG)

14

57	634 (29.6)	543	1177
69	348 (16.2)	69	417
417	282 (13.1)	1300	1582
438	185 (8.6)	1906	2091
543	150 (7.0)	1582	1732
1177	123 (5.7)	1177	1300
1300	105 (4.9)	438	543
1582	84 (3.9)	1788	1872
1732	57 (2.7)	1	57
1788	56 (2.6)	1732	1788
1872	36 (1.7)	2109	2145
1906	34 (1.6)	1872	1906
2091	21 (1.0)	417	438
2109	18 (0.8)	2091	2109
	12 (0.6)	57	69

HPH 1 (GGTGA)

6

453	665 (31.0)	1125	1790
1108	655 (30.5)	453	1108
1125	453 (21.1)	1	453
1790	271 (12.6)	1874	2145
1837	47 (2.2)	1790	1837
1874	37 (1.7)	1837	1874
	17 (0.8)	1108	1125

MBO 2 (GAAGA)

9

99	921 (42.9)	126	1047
126	415 (19.3)	1047	1462
1047	276 (12.9)	1462	1738
1462	225 (10.5)	1738	1963
1738	99 (4.6)	1	99
1963	90 (4.2)	2055	2145
2043	80 (3.7)	1963	2043
2052	27 (1.3)	99	126
2055	9 (0.4)	2043	2052
	3 (0.1)	2052	2055

MST 2 (CCTNAGG)

1

913	1232 (57.4)	913	2145
	913 (42.6)	1	913

NRU 1 (TCGCGA)

2

102	1435 (66.9)	102	1537
1537	608 (28.3)	1537	2145
	102 (4.8)	1	102

RSA 1 (GTAC)

6				
	756	756 (35.2)	1	756
	1260	549 (25.6)	1260	1809
	1809	504 (23.5)	756	1260
	1815	244 (11.4)	1850	2094
	1850	51 (2.4)	2094	2145
	2094	35 (1.6)	1815	1850
		6 (0.3)	1809	1815

SAU 1 (MST 2) (CCTNAGG)

1				
	913	1232 (57.4)	913	2145
		913 (42.6)	1	913

SAU 3A (MBO 1) (GATC)

5				
2		1371 (63.9)	2	1373
	1373	477 (22.2)	1664	2141
	1439	225 (10.5)	1439	1664
	1664	66 (3.1)	1373	1439
	2141	4 (0.2)	2141	2145
		2 (0.1)	1	2

STU 1 (AGGCCT)

2				
	1129	1129 (52.6)	1	1129
	1658	529 (24.7)	1129	1658
		487 (22.7)	1658	2145

TAQ 1 (TCGA)

6				
	304	521 (24.3)	1564	2085
	580	504 (23.5)	1060	1564
	928	348 (16.2)	580	928
	1060	304 (14.2)	1	304
	1564	276 (12.9)	304	580
	2085	132 (6.2)	928	1060
		60 (2.8)	2085	2145

XHO 2 (PGATCQ)

2				
1		2139 (99.7)	1	2140
	2140	5 (0.2)	2140	2145
		1 (0.0)	1	1

XMN 1(ASP700) (GAANNNTTC)

2				
	429	1323 (61.7)	429	1752
	1752	429 (20.0)	1	429
		393 (18.3)	1752	2145

Tab. 21: Übersicht der Restriktionsenzym-Schnittstellen im Rifampicin-Resistenzgen 3d^{rif}

Diese Tabelle erfaßt die über Computeranalyse ermittelte Anzahl und Anordnung aller wesentlichen, auf dem 2145 bp Rifampicin-Resistenzgen 3d^{rif} vorkommenden Restriktionsenzym-Schnittstellen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Aiba, H., Kawamukai, M., and Ishihama, A. (1983)
Cloning and promoter analysis of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene
Nucleic Acids Res. 11, 3451-3456.
- Albertini, A.M., Hofer, M., Calos, M.P. and Miller, J.H. (1982)
On the Formation of Spontaneous Deletions: The Importance of Short Sequence Homologies in the Generation of Large Deletions
Cell 29, 319-328.
- Allison, L.A., Moyle, M., Shales, M. and Ingles, C.M. (1985)
Extensive Homology among the Largest Subunit of Eukaryotic and Prokaryotic RNA Polymerases
Cell 42, 599-610.
- Altenbuchner, J., Schmid, K. and Schmitt, R. (1983)
Tn1721-encoded tetracycline resistance: mapping of structural and regulatory genes mediating resistance
J. Bacteriol. 153, 116-121.
- Ames, G.F.-L. (1986)
Bacterial Periplasmic Transport Systems: Structure, Mechanism, and Evolution
Annu. Rev. Biochem. 55, 397-425.
- Ames, G.F.-L. and Nikaido, K. (1978)
Identification of a membrane protein as histidine transport component in *Salmonella typhimurium*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5447-5451.
- Anderson, S. (1981)
Shotgun DNA sequencing using DNaseI-generated fragments
Nucleic Acids Res. 9, 4087-4098.
- Babinet, C. (1971)
Proprietes de dominance de quelques mutations confirant la resistance a la rifampicine chez *E.coli* K12
Biochimie 53, 507-516.
- Barnes, W.M. and Bevan, M. (1983)
Kilo-sequencing: an ordered strategy for rapid DNA sequence data acquisition
Nucleic Acids Res. 11, 349-368.
- Bertrand, K.P., Postle, K., Wray Jr., L.V., and Reznikoff, W.S. (1983)
Overlapping divergent promoters control expression of Tn10 tetracycline resistance
Gene 23, 149-156.
- Biggin, M.D., Gibson, T.J., and Hong, G.F. (1983)
Buffer gradient gels and [³⁵S]-label as an aid to rapid DNA sequence determination
Proc. Natl. Acad. USA 80, 3963-3965.

- Binda, G., Domenichini, E., Gottardi, A., Orlandi, E., Ortelli, E., Pacini, B. and Fowst, G. (1971)
Rifampicin, a general review
Arzneimittelforsch. 21, 1907-1977.
- Birnboim C. and Doly, J. (1979)
Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.
- Boeke, J.D. and Model, P. (1982)
A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminus of bacteriophage fl geneIII protein retains it in the membrane
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5200-5204.
- Bolivar, F. Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C. Heyneker, H.L. and Boyer, H.W. (1977)
Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.
Gene 2, 95-113.
- Boothroyd, C.M., Malet, R.M., Nene, V., and Glass, R.E. (1983)
Genetic Studies on the β Subunit of *Escherichia coli* RNA Polymerase.
III. Analysis of Low-Level Rifampicin-Resistant Mutants
Mol. Gen. Genet. 190, 523-526.
- Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969)
A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*
J. Mol. Biol. 41, 459-472.
- Brendel, V. and Trifonov, E.N. (1984)
A computer algorithm for testing potential Prokaryotic terminators
Nucleic Acids Res. 12, 4411-4427.
- Brenner, D.G. and Shaw, W.V. (1985)
The use of synthetic oligonucleotides with universal templates for rapid DNA sequencing: results with staphylococcal replicon pC221
EMBO J. 4, 561-568.
- Capaldi, R.A., Marshall, F.A., and Staples, S.J. (1983)
Structure of intrinsic membrane proteins and their amino acid sequences
Comments Mol. Cell. Biophys. 1, 365-381.
- Chaconas, G., de Bruijn, F.J., Casadaban, M.J., Lupski, J.R., Khoh, T.J., Harshey, R.M., DuBow, M.S., and Bukhari, A.I. (1981)
In vitro and *in vivo* manipulations of bacteriophage Mu DNA: Cloning of Mu ends and construction of mini-Mu's carrying selectable markers
Gene 13, 37-46.

- Chaconas, G. and van de Sande, J.H. (1980)
5'-³²P Labelling of RNA and DNA restriction fragments.
Methods Enzymol. 65, 75-85.
- Charbit, A., Clement, J.M., and Hofnung, M. (1984)
Further Sequence Analysis of the Phage Lambda Receptor Site
J. Mol. Biol. 175, 395-401.
- Chen, E.J. and Seeburg, P.H. (1985)
Supercoil Sequencing: a fast simple method for sequencing
plasmid DNA
DNA 4, 165-170.
- Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1974)
Prediction of protein conformation
Biochemistry 13, 222-245.
- Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1978)
Prediction of the secondary structure of proteins from their
amino acid sequence
Adv. Enzymol. 47, 45-148.
- Cohen, G.H., Dietzschold, B., Ponce de Leon, M., Long, D., Golub, E., Varrichio, A., Pereira, L., and Eisenberg, R.J. (1984)
Localization and synthesis of an antigenic determinant of
Herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the pro-
duction of neutralizing antibody
J. Virol. 49, 102-108.
- Clarke, L. and Carbon, J. (1976)
A colony bank containing synthetic ColE1 Hybrid Plasmids
representative of the entire *E.coli* genome
Cell 9, 91-99.
- Collins, J. (1980)
Instability of Palindromic DNA in *Escherichia coli*
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45, 409-416.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L. (1972)
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic
transformation of *E.coli* by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110-2114.
- Church, G.M. and Gilbert, W. (1984)
Genomic sequencing
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1991-1995.
- Dabbs, E.R. and Looman, K. (1981)
An Antibiotic Dependent Conditional Lethal Mutant with a
Lesion Affecting Transcription and Translation
Mol. Gen. Genet. 184, 224-229.
- Dabbs, E.R. (1982)
Three Additional Loci of Rifampicin Dependence in *Escherichia coli*
Mol. Gen. Genet. 187, 519-522.

- Dayhoff, M.O., Hunt, L.T., and Hurst-Calderone, S. (1978)
Composition of Proteins
in *Atlas of Proteins Sequence and Structure*, M.O. Dayhoff,
Ed. Vol. 5, Suppl. 3, 363-369.
- Decad, G.M. and Nikaido, H. (1976)
Outer membrane of gram-negative bacteria.
XII. Molecular sieving function of cell wall
J. Bacteriol. 128, 325-336.
- Deininger, P.L. (1983)
Random Subcloning of Sonicated DNA: Application to Shotgun
DNA Sequence Analysis
Anal. Biochem. 129, 216-223.
- Donaldson, D.M., Roberts, R.R., Larson, H.S. and Tew, J.C. (1974)
Interrelationship between serum beta-lysin, lysozyme, and
the antibody-complement system in killing *Escherichia coli*
Infect. Immun. 10, 657-666.
- Dugaiczky, A. Boyer, H.W. and Goodman, H.M. (1975)
Ligation of *EcoRI* endonuclease generated DNA fragments into
linear and circular structures.
J. Mol. Biol. 96, 171-184.
- Engelman, D.M. and Zaccai, G. (1980)
Bacteriorhodopsin is an inside-out protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5894-5898.
- Foster, D.L., Boublik, M., and Kaback, H.R. (1983)
Structure of the lac carrier protein of *E.coli*
J. Biol. Chem. 258, 31-34.
- Fowler, T., Taylor, L., and Thompson, R. (1983)
The control region of the F plasmid Transfer operons: DNA
sequence of the *traJ* and *traY* genes and characterisation of
the *traY-Z* promoter
Gene 26, 79-89.
- Frischauf, A.M., Garoff, H., and Lehrach, H. (1980)
A subcloning strategy for DNA sequence analysis
Nucleic Acids Res. 8, 5541-5549.
- Gabay, J., Schenkman, S. Desaynard, C. and Schwartz, M. (1985)
Monoclonal Antibodies Against Bacteria
In Macario, A.J.L. and Macario, C. (eds.)
Academic Press, NY, Vol 2, 249-282.
- Gale, E.F., Cundcliffe, F., Reynolds, P.F., Richmond, M.H., and
Waring, M.J., Eds. (1981)
The Molecular Basis of Antibiotic Action, 2nd ed., John Wiley
& Sons, London.
- Glickman, B.W. and Ripley, L.S. (1984)
Structural intermediates of deletion mutagenesis. A role for
palindromic DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 512-516.

- Glauert, A.M. and Thornley, M.J. (1969)
The topography of the bacterial cell wall
Annu. Rev. Microbiol. 23, 159-198.
- Gold, L. Pribnow, D., Schneider, T., Shinedleing, S., Singer, B.S. and Stormo, G. (1981)
Translational initiation in prokaryotes
Annu. Rev. Microbiol. 35, 365-403.
- Gouy, M. and Gautier, C. (1982)
Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity
Nucleic Acids Res. 10, 7055-7074.
- Grachev, M.A., Hartmann, G.R., Maximova, T.G., Mustaev, A.A., Schäffner, A.R., Sieber, H., and Zaychikov (1986)
Highly selective affinity labelling of RNA polymerase B (II) from wheat germ
FEBS Lett. 200, 287-290.
- Grachev, M.A. and Zaychikov, E.F. (1983)
in: Affinity Modification of Biopolymers (Knorre, D.G. ed.)
pp. 149-187, Nauka, Siberian Division, Novosibirsk.
- Groenen, M.A.M., Timmers, E. and van de Putte, P. (1985)
DNA sequences at the ends of the genome of bacteriophage Mu essential for transcription
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2087-2091.
- Grosjean, H. and Fiers, W. (1982)
Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes
Gene 18, 199-209.
- Grunstein, M. and Hogness, D.S. (1975)
Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNA's that contain a specific gene
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965.
- Guo, L.H. and Wu, R. (1982)
New rapid methods for DNA sequencing based on exonucleaseIII digestion followed by repair synthesis
Nucleic Acids Res. 10, 2065-2084.
- Hanahan, D. and Meselson, M. (1980)
Plasmid screening at high colony density.
Gene 10, 63-67.
- Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. 166, 557-580.
- Harder, K.J., Nikaido, H. and Matsubashi, M. (1981)
Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain β -lactam compounds lack the *ompF* porin
Antimicrob. Agents Chemother. 20, 549-552.

- Hartmann, G., Honikel, K.O., Knüsel, F. and Nüesch J. (1967)
The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin
Biochim. Biophys. Acta 145, 843-844.
- Hartmann, G.R., Heinrich, P., Kollenda, M.C., Skrobranek, B., Tropschug, M. und Weiß, W. (1985)
Molekulare Wirkungsweise des Antibioticums Rifampicin
Angew. Chem. 97, 1011-1017.
- Hawley, D.K. and McClure, W.R. (1982)
Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences
Nucleic Acids Res. 11, 2237-2255.
- Hazelbauer, G.L. (1975)
Role of receptor for bacteriophage lambda in the functioning of the maltose chemoreceptor of *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 124, 119-126.
- Harwood, C.R., Williams, D.M., and Lovett, P.S. (1983)
Nucleotide sequence of a *Bacillus pumilus* gene specifying chloramphenicol acetyltransferase
Gene 24, 163-169.
- Heijne von, G. (1984)
How Signal Sequences Maintain Cleavage Specificity
J. Mol. Biol. 173, 243-251.
- Henikoff, S. (1984)
Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing
Gene 28, 351-359.
- Henning, U. and Haller, I. (1975)
Mutants of *Escherichia coli* K12 lacking all "major" proteins of the outer cell envelope membrane
FEBS Lett. 55, 161-164.
- Hong, G.F. (1982)
A Systematic DNA Sequencing Strategy
J. Mol. Biol. 158, 539-549.
- Hopp, T.P. and Woods, K.R. (1981)
Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3824-3828.
- Horinouchi, S. and Weisblum, B. (1982)
Nucleotide sequence and functional map of pCl94, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance
J. Bacteriol. 150, 815-821.
- Hunkapiller, M., Kent, S., Caruthers, M., Dreyer, W., Firla, J., Giffin, L., Horvath, S., Hunkapiller, T., Tempst, P., and Hood, L. (1984)
A microchemical facility for the analysis and synthesis of genes and proteins
Nature 310, 105-115.

- Ikemura, T. and Ozeki, H. (1982)
Codon Usage and Transfer RNA Contents: Organism-specific
Codon-choice Patterns in Reference to the Isoacceptor
Contents
Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 47, 1087-1097.
- Itakura, K., Rossi, J.J., and Wallace, R.B. (1984)
Synthesis and use of synthetic oligonucleotides
Annu. Rev. Biochem. 53, 323-356.
- Yannisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors
Gene 33, 103-119.
- Jasin, M., Regan, L. and Schimmel, P. (1983)
Modular arrangement of functional domains along the sequence of an aminoacyl tRNA synthetase.
Nature 306, 441-447.
- Jaurin, B., Grundström, T., Edlund, T., and Normark, S. (1981)
The *E. coli*- β -lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation
Nature 290, 221-225.
- Johnston, D.E. and McClure, W.R. (1976)
Abortive Initiation of *in vitro* RNA Synthesis on Bacteriophage Lambda DNA, in RNA Polymerase
Losick, R. and Chamberlin, M.J., eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 413-428.
- Kahmann, R., Kamp, D. and Zipser, D. (1977)
Mapping of Restriction Sites in Mu DNA
in DNA: Insertion Elements, Plasmids, and Episomes
Bukhari, A.E. (ED), Shapiro, J.A. (ED) *et al.*
Cold Spring Harbor Laboratory, 335-339.
- Kessler, C. (1980)
Die Wirkung des Antibiotikums Rifampicin auf den Beginn der *Escherichia coli* RNA Polymerase Reaktion
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Khorana, H.G., Gerber, G.E., Herliky, W.C., Gray, C.P., Anderegg, R.J., Nihei, K., and Biemann, K. (1979)
Amino acid sequence of bacteriorhodopsin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5046-5050.
- Kollenda, M.C. (1981)
Vergleichende Membranuntersuchungen an Rifampicin-Eindringungsresistenten Mutanten und Transduktanten von *Escherichia coli*.
Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

- Kollenda, M.C. (1985)
Charakterisierung eines Rifampicin-Resistenz vermittelnden Gens aus *Escherichia coli*.
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Komatsu, Y., Murakami, K. and Nishikawa, T. (1981)
Penetration of moxalactam into its target proteins in *Escherichia coli* K-12: comparison of a highly moxalactam-resistant mutant with its parent strain
Antimicrob. Agents Chemother. 20, 613-619.
- Konigsberg, N. and Godson, N. (1983)
Evidence for the use of rare codons in the *dnsG* gene and other regulatory genes of *Escherichia coli*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 687-691.
- Langridge, I., Langridge, P., and Bergquist, P.L. (1980)
Extraction of nucleic acids from agarose gels
Anal. Biochem. 103, 264-271.
- Leach, D. and Symonds, N. (1979)
The isolation and Characterisation of a Plaque-Forming Derivative of Bacteriophage Mu Carrying a Fragment of Tn3 Conferring Ampicillin Resistance
Mol. Gen. Genet. 172, 179-184.
- Leive, L. (1974)
The barrier function of the gram-negative envelope
Annu. N.Y. Acad. Sci. 235, 109-127.
- Lindahl, L., Yamamoto, M., Nomura, M., Kirschbaum, J.B., Allet, B. and Rochaix, J.D. (1977)
Mapping of a cluster of genes for components of the transcriptional and translational mechanisms of *Escherichia coli*
J. Mol. Biol. 109, 23-47.
- Lipkin, V.M., Chertov, O.Y., Makarova, J.A., Monastyrskaya, G.S., Sverdlov, E.D. and Ovchinnikov, Y.A. (1984)
Structural-Functional studies of DNA-dependent RNA Polymerase
Chemistry of Peptides and Proteins, Vol. 2.
Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York, 387-394.
- Lisitsyn, N.A., Guryev, S.O., Moiseyeva, E.P. and Nikiforov, V.G. (1984a)
Nucleotide substitutions in the *rpoB* gene leading to rifampicin resistance of *E.coli* RNA polymerase
Biorg. Khim. 10, 127-128.
- Lisitsyn, N.A., Sverdlov, E.D., Moiseyeva, E.P., Danilevskaya, O.N., and Nikiforov, V.G. (1984b)
Mutation to rifampicin resistance at the beginning of the RNA polymerase β subunit in *Escherichia coli*
Mol. Gen. Genet. 196, 173-174.
- Maggi, N., Pasqualucci, C.R., Ballotta, R. and Sensi, P. (1966)
Rifampicin: a new orally active rifamycin
Chemotherapy 11, 285-292.

- Marmur, J. (1961)
A Procedure for the Isolation of Desoxyribonucleic Acid from Micro-Organisms
J. Mol. Biol. 3, 208-218.
- McClure, W.R. and Cech, C.L. (1978)
On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis
J. Biol. Chem. 253, 8949-8956.
- Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P.H. (1981)
A system for shotgun DNA sequencing
Nucleic Acids Res. 9, 309-321.
- Messing, J. and Vieira, (1982)
A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double digest restriction fragments
Gene 19, 269-276.
- Messing, J. (1983)
Mew M13 vectors for cloning, in Wu, R., Grossman, L., Mol-dave, K. (Eds)
Methods in Enzymology 101, 20-78.
- Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, D.K., and Efstradiatis, A. (1978)
The isolation of structural genes from libraries of euca-riotic DNA.
Cell 15, 687-697.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980)
Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages
Methods Enzymol. 65, 499-560.
- Messing, J., Crea, R., and Seeburg, P.H. (1981)
A system for shotgun DNA sequencing
Nucleic Acids Res. 9, 309-321.
- Messing, J. and Vieira, J. (1982)
A new pair of M13 vectors fpr selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments
Gene 19, 269-276.
- Michel, B. and Ehrlich, S.D. (1986)
Illegitimate recombination at the replication origin of bacteriophage M13.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3386-3390.
- Mindlin, S.Z., Ilyina, T.S., Voeykova, T.A. and Velkov, V.V. (1972)
Genetical analysis of rifampicin resistant mutants of *E.coli* K12
Mol. Gen. Genet. 115, 115-121.

- Mizuno, T., Chou, M.Y. and Inouye, M. (1984)
A unique mechanism regulatory gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (mic RNA)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1966-1970.
- Mulligan, M.E., Hawley, D.K., Entriken, R., and McClure, W.R. (1984)
Escherichia coli promoter sequences predict *in vitro* RNA polymerase selectivity
Nucleic Acids Res. 12, 789-800.
- Nikaido, H. (1979)
Die Permeabilität der äußeren Bakterienmembran
Angew. Chem. 91, 394-407.
- Nikaido, H. and Nakae, T. (1979)
The outer membrane of gram-negative bacteria
Adv. Microb. Physiol. 20, 163-250.
- Nikaido, H. and Vaara, M. (1985)
Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability
Microbiol. Rev. 49, 1-32.
- Nikaido, H. and Wu, H.C.P. (1984)
Amino acid sequence homology among the major outer membrane protein of *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1048-1052.
- Norrande, J., Kempe, T., and Messing, J. (1983)
Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis
Gene 26, 101-106.
- Oliver, D. (1985)
Protein Secretion in *Escherichia coli*
Annu. Rev. Microbiol. 39, 615-648.
- Osborn, M.J. (1979)
Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide of the outer membrane
In Bacterial outer membranes, M. Inouye (ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, 15-34.
- Ovchinnikov, Yu.A., Monastyrskaya, G.S., Gubanov, V.V., Guryev, S.O., Chertov, O.Yu., Modyanov, N.N., Grinkevich, V.A., Makarova, I.A., Marchenko, T.V., Polvnikova, I.N., Lipkin, V.M. and Sverdlov, E.D. (1981a)
The primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. Nucleotide sequence of the *rpoB* gene and amino acid sequence of the β -subunit
Eur. J. Biochem. 116, 621-629.
- Ovchinnikov, Yu.A., Monastyrskaya, G.S., Gubanov, V.V., Lipkin, V.M., Sverdlov, E.D., Kiver, I.F., Bass, I.A., Mindlin, S.Z., Danielevskaya, O.N. and Khesin, R.B. (1981b)
Primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. Nucleotide substitution in the β subunit gene of the rifampicin resistant *rpoB255* mutant
Mol. Gen. Genet. 184, 536-538.

- Ovchinnikov, Yu.A., Monastyrskaya, G.S., Guriev, S.O., Kalinina, N.F., Sverdlov, E.D., Gragerov, A.I., Bass, I.A., Kiver, I. F., Moiseyeva, E.P., Igumnov, V.N., Mindlin, S.Z., Nikiforov, V.G. and Khesin, R.B. (1983)
RNA Polymerase Rifampicin Resistance Mutations in *Escherichia coli*: Sequence Changes and Dominance
Mol. Gen. Genet. 190, 344-348.
- Patterson-Delafield, J., Martinez, R.J., and Lehrer, R.J. (1980)
Microbicidal cationic proteins in rabbit alveolar macrophages:
Infect. Immun. 30, 180-192.
- Peden, K.W.C. (1983)
Revised sequence of the tetracycline-resistance Gene of pBR322
Gene 22, 277-280.
- Pestka, S. (1977)
Inhibitors of protein synthesis, in
Molecular Mechanism of Protein Biosynthesis
(Weissbach, H. and Pestka, S., Eds.),
Academic Press, New York.
- Plasterk, R.H.A., Vollering, M., Brinkmann, A., and van de Putte, P. (1984)
Analysis of the Methylation-Regulated Mu *mom* transcript
Cell 36, 1189-196.
- Post, L.E., Strycharz, G.D., Nomura, M., Lewis, H. and Denis, P.P. (1979)
Nucleotide sequence of the ribosomal proteine gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase β in *Escherichia coli*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1697-1701.
- Postle, K. and Good, R.F. (1985)
A Bidirectional Rho-Independent Transcription Terminator between the *E. coli tonB* Gene and an Opposing Gene
Cell 41, 577-585.
- Prelog, V. and Oppolzer, W. (1973)
Ansamycine, eine neuartige Klasse von mikrobiellen Stoffwechselprodukten
Helv. Chim. Acta 56, 2279-2287.
- Pribnow, D. (1979)
Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequence of two RNA polymerase binding sites
J. Mol. Biol. 99, 419-433.
- Priess, H., Kamp, D., Kahmann, R., Brauer, B. and Delius, H. (1982)
Nucleotide sequence of the immunity region of bacteriophage Mu
Mol. Gen. Genet. 186, 315-321.

- Richmond, M.H. and Curtis, N.A.C. (1974)
The interplay of β -lactamase and intrinsic factors in the resistance of gram-negative bacteria to penicillins and cephalosporins
Annu. N.Y. Acad. Sci. 235, 553-568.
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977)
Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I
J. Mol. Biol. 113, 237-251
- Riva, S. and Silvestri, L.G. (1972)
Rifamycins: A General View
Annu. Rev. Microbiol. 26, 199-224.
- Rosenberg, M. and Court, D. (1979)
Regulatory Sequences involved in the Promotion and Termination of RNA Transcription
Annu. Rev. Genet. 13, 319-353.
- Samraoui, B.J., Sutton, R.J., Todd, P.J., Artymiuk, S.G., Waley, D. and Phillips, C. (1986)
Tertiary structural similarity between a class A β -lactamase and a penicillin-sensitive D-alanyl carboxypeptidase-transpeptidase
Nature 320, 378-380.
- Sanger, F., Micklen, S., and Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. USA 74, 5463-5467.
- Sarkar, H.K., Viitanen, P.V., Poonian, M.S., and Kaback, H.R. (1986)
Substitution of Glutamine-60 with Glutamic Acid Causes the *lac* Permease of *Escherichia coli* To Become Temperature Sensitive
Biochemistry 25, 2778-2781.
- Scherer, G.F.E., Walkinshaw, M.D., Arnott, S., and Moore, D.J. (1980)
The ribosome binding sites recognized by *E. coli* ribosomes have regions with signal characters in both the leader and protein segments
Nucleic Acids Res. 8, 3895-3907.
- Schindler, H. and Rosenbusch, J.P. (1981)
Matrix protein in planar membranes: clusters of channels in a native environment and their functional reassembly
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2302-2306.
- Schweizer, M., Schwarz H., Sonntag, I., and Henning, U. (1976)
Mutational change of membrane architecture. Mutants of *Escherichia coli* K12 missing major proteins of the outer cell envelope membrane
Biochim. Biophys. Acts 448, 474-491.

- Seydel, F., Lill, H.R. and Hartmann, G.R. (1981)
Isolation of a second rifamycin-binding protein from
Escherichia coli by affinity chromatography
Eur. J. Biochem. 117, 87-91.
- Shine, J. and Dalgarno, L. (1974)
The 3'-Terminal Sequence of *Escherichia coli* 16S Ribosomal
RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome
Binding Sites
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1342-1346.
- Shuman, H.A., Silhavy, T.J., Beckwith, J. (1980)
Labeling of Proteins with β -Galactosidase by Gene Fusion
J. Biol. Chem. 255, 168-174.
- Smith, M., Leung, D.W., Gillam, S., Astell, C.R., Montgomery, D.
L., and Hall, B.D. (1979)
Sequence of the gene for iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces*
cerevisiae
Cell 16, 753-761.
- Sonntag, I., Schwarz, H., Hirota, Y. and Henning, U. (1978)
Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants
missing the outer membrane lipoprotein and other major outer
membrane proteins
J. Bacteriol. 135, 280-285.
- Southern, E.M. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments separated
by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517.
- Stormo, G.D., Schneider, T.D., and Gold, L.M. (1982)
Characterization of translational initiation sites in
E. coli
Nucleic Acids Res. 10, 2971-2995.
- Sutcliffe, J.G. (1979)
Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid
pBR322.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-90.
- Tinoko, Jr.I., Borer, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck,
O.C., Crothers, D.M., and Gralla, J. (1973)
Improved estimation of secondary structure in ribonucleic
acid
Nature New Biology 246, 40-41.
- Tittawella, J.P.B. (1981)
Escherichia coli Merodiploids with Altered Ratios of Episomal
to Chromosomal RNA Polymerase Activity
Mol. Gen. Genet. 184, 504-507
- Tittawella, J.P.B. (1985)
Mutant of *Escherichia coli* with unusual patterns of *rpoB*, C
expression in response to rifampicin and acridine orange
Mol. Gen. Genet. 200, 114-117.

- Tropschug, M. (1981)
 Untersuchungen zur Aufnahme von Rifamycinen in *Escherichia coli* K12.
 Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Vieira, J. and Messing, J. (1982)
 The pUC-plasmids, a M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
Gene 19, 259-268.
- Voordouw, G. and Brenner, S. (1985)
 Nucleotide sequence of the gene encoding the hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough)
Eur. J. Biochem. 148, 515-520.
- Wallace, R.B., Jokuson, M.J., Suggs, S.V., Miyaski, K., Bhatt, R. and Itakura, K. (1981)
 A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322
Gene 16, 21-26.
- Wehrli, W. (1983)
 Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance
Rev. Infect. Dis. 5, 407-411.
- Weisblum, B. (1984)
 Inducible Erythromycin Resistance in Bacteria
Brit. Med. Bull. 1, 47-53.
- Westhoff, E., Altschuh, D., Moras, D., Bloomer, A.C., Mondragon, A., Klug, A. and Regenmortel, M.H.V. (1984)
 Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determination in proteins
Nature 311, 123-126.
- Williams, G.B. and Blattner, F.R. (1980)
 Bacteriophage Lambda Vectors for DNA cloning. In "Genetic Engineering", Setlow, J.K. and Hollaender, A. (eds).
 Plenum Press, New York and London, Vol.2, 201-281.
- Williams, D.M., Duvall, E.J., and Lovett, P.S. (1981)
 Cloning Restriction Fragments That Promote Expression of a Gene in *Bacillus subtilis*
J. Bacteriol. 146, 1162-1165.
- Winberg, G. and Hammarskjöld, M.L. (1980)
 Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA
Nucleic Acids Res. 8, 253-264.
- Winnacker, E.-L. (1984)
 Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie.
 Verlag Chemie, Weinheim.

Yamamoto, M. and Nomura (1978)

Co-transcription of genes for RNA polymerase subunits beta and beta-prime with genes for ribosomal proteins in *Escherichia coli*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 3891-3895.

Yamamoto, M. and Nomura (1979)

Organization of Genes for Transcription and Translation in the rif Region of the *Escherichia coli* Chromosome

J. Bacteriol. 137, 584-594.

Zähner, H. and Maas, W.K. (1972)

Biology of Antibiotics

Springer Verlag, Berlin und Heidelberg.

Zinder, N.D. and Boeke, J.D. (1982)

The filamentous phage (Ff) as vectors for recombinant DNA-a review

Gene 19, 1-10.

LEBENS LAUF

Name	Peter Heinrich
Geburtsdatum	28.06.1955
Geburtsort	Aindling
Eltern	Michael Heinrich Maria Magdalena Heinrich, geb. Sauer
Familienstand	Seit dem 19.06.1980 verheiratet mit Susanne Heinrich, geb. Aumann, 1 Tochter
1961 - 1967	Volksschule in Aindling
1967 - 1974	Gabrieli-Gymnasium in Eichstätt
1974	Abitur
1974 - 1975	Grundwehrdienst in Landsberg/Lech
1975 - 1976	Studium Englisch/Latein an der Universität München + Musik am Leopold Mozart Konservatorium Augsburg
1976 - 1983	Studium der Biologie/Chemie (Höheres Lehramt) an der Universität München 1982: 1. Staatsexamen 1983: Diplom-Hauptprüfung Biologie Zulassungsarbeit und Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München im Arbeitskreis von Prof. Dr. G.R. Hartmann unter Anleitung von Dr. G.B. Kresze (Thema: "Isolierung und Charakterisierung der Lipoyldehydrogenase aus Bäckerhefe")
05.1983 - 11.1986	Doktorarbeit am selben Institut unter Anleitung von Prof. Dr. G.R. Hartmann (Thema: "Klonierung und Sequenzierung von Rifampicin-Resistenzgenen")

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Hartmann, G.R., Heinrich, P., Kollenda, M.C., Skrobranek, B., Tropschug, M. und Weiß, W. (1985)
Molekulare Wirkungsweise des Antibiotikums Rifampicin
Angew. Chem. 97, 1011-1017.

Weitere Publikationen:

Heinrich, P., Ronft, H., Schartau, W. and Kresze, G.B. (1983)
Lipoamid Dehydrogenase from Baker's Yeast
Improved Purification and Some Molecular, Kinetic, and
Immunochemical Properties
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 41-50.

Heinrich, P. (1986)
Guidelines for quick and simple Plasmid Sequencing
Boehringer Mannheim.

Heinrich, P. (1986)
Plasmid Sequencing: an attractive alternative to conventional
sequencing techniques
Colloquium 2, Boehringer Mannheim.

